



Modulation de l'apport en acides gras polyinsaturés n-3 : intérêt chez le sujet sain et au cours de l'insuffisance rénale chronique

Fitsum Guebre-Egziabher

► To cite this version:

Fitsum Guebre-Egziabher. Modulation de l'apport en acides gras polyinsaturés n-3 : intérêt chez le sujet sain et au cours de l'insuffisance rénale chronique. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10126 . tel-00903384

HAL Id: tel-00903384

<https://theses.hal.science/tel-00903384>

Submitted on 12 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 6 Juillet 2010

par

Mme GUEBRE-EGZIABHER Fitsum

TITRE :

Modulation de l'apport en acides gras polyinsaturés n-3 : intérêt chez le sujet sain et au cours de l'insuffisance rénale chronique

Directeur de thèse : Professeur Denis FOUQUE

JURY : M. le Professeur Denis Fouque
M. le Professeur Jacques Delarue
M. le Professeur Noel Cano
M. le Professeur Michel Lagarde

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Remerciements

Au Pr Denis Fouque, qui m'a guidée, encouragée, conseillée toutes ces années. Je lui dois d'avoir trouvé ma voie en recherche sur la nutrition et le métabolisme et de m'avoir donnée la possibilité d'aller plus loin dans la recherche fondamentale dans ce domaine stimulant qu'est le métabolisme énergétique au cours de pathologies rénales. Qu'il soit assuré de mon admiration, de ma gratitude et de mon désir de poursuivre notre collaboration.

Au Pr Noel Cano, vous me faites l'honneur d'accepter d'être rapporteur et jury de cette thèse

Au Pr Jacques Delarue, vous me faites l'honneur d'être rapporteur et jury de cette thèse

Au Pr Michel Lagarde, pour avoir accepté d'être jury de ma thèse. J'espère pouvoir bénéficier de vos conseils sur les futurs projets de recherche sur les oméga trois à mon retour en France,

A Thierry, ma moitié dont l'amour, les conseils et le soutien m'ont été et me sont encore indispensables.

A mes enfants chéris : Thomas, Sarah, Romane vous me donnez la force de me battre au quotidien

A ma mère

A mes frères et sœurs

Ce travail a été réalisé au sein de :

L'unité Inserm u 870
Régulation métabolique, nutrition diabète
Université Claude Bernard Lyon 1

Sous la direction de Pr Fouque Denis

Publications scientifiques originales dans des revues internationales à comité de lecture

En rapport avec le travail de thèse :

1. **Guebre-Egziabher F**, Bernhard J, Funahashi T, Hadj-Aïssa A, Fouque D. Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function. *Nephrol Dial transplant* 2005, 20(1): 129-34.
2. **Fitsum Guebre-Egziabher**, Rémi Rabasa-Lhoret, Fabrice Bonnet, Jean-Philippe Bastard, Michel Desage, Michael R. Skilton, Hubert Vidal, Martine Laville. Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects. *Eur J Clin. Nutr Aug* 2008, 62 :1287-93
3. **Guebre-Egziabher F**, Debard C, Draï J, Denis L, Pesenti S, Bienvenu J, Vidal H, Laville M, Fouque D. Differential dose effect of fish oil supplementation on inflammation and adipose tissue gene expression in chronic kidney disease patients before dialysis. *Soumis Clinical Journal of American Society of Nephrology*.

Autres publications :

1. Pouteil-Noble C, Guebre F. Effect of immunosuppressants on lipids. *Néphrologie*. 2000, f21 : 369-372
2. Fouque D, **Guebre-Egziabher F**, Laville M. Advances in anabolic interventions for malnourished dialysis patients. *J Ren Nutr*. 2003, Apr;13(2):161-5.
3. Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, **Guebre-Egziabher F**, Riou JP, Laville M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Vidal H. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003, 52(6):1319-25.
4. Rabasa-Lhoret R, Bastard JP, Jan V, Ducluzeau PH, Andreelli F, **Guebre F**, Bruzeau J, Louche-Pellissier C, Maltrepierre C, Peyrat J, Chagne J, Vidal H, Laville M. Modified quantitative insulin sensitivity check index is better correlated to hyperinsulinemic glucose clamp than other fasting-based index of insulin sensitivity in different insulin-resistant States. *J Clin Endocrinol Metab.* , 2003;88(10):4917-23
5. **Guebre-Egziabher F**, Fouque D. Metabolic consequences of inflammation in kidney failure. *Nephrologie* 2003,24 : 283-286.
6. **Guebre-Egziabher F**, Easy F, Juillard L, Fouque D, Valette PJ. Percutaneous ethanol injection treatment of severe hyperparathyroidism in maintenance dialysis : risks and benefits. *Hemodialysis international*, 2004, 8 : 214-218

7. **Guebre-Egziabher F**, Bernhard J, Geelen G, Malvoisin E, Hadj-Aïssa A, Fouque D. Leptin, adiponectin, and ghrelin dysregulation in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2005 Jan;15(1):116-20.
8. Brodin-Sartorius A, **Guebre-Egziabher F**, Fouque D, Cozon G, Villar E, Laville M, Juillard L Recurrent idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a role for vaccination in disease relapse? *Am J Kidney Dis*. 2006;48(3):e31-4.
9. Fouque D, Holt, **Guebre-Egziabher F**, Nakamura K, Vianey-Saban C, Hadj-Aïssa A, Hoppel CL and Kopple JD. Relationship between serum carnitine, acylcarnitines and renal function in patients with chronic renal disease. *J Ren Nut* 2006,16:125-31
10. **Fitsum Guebre-Egziabher**, Jocelyne Draï, Denis Fouque. Adiponectin and chronic kidney disease. *J Ren Nut* 2007,17:9-12.
11. Denis Fouque, **Fitsum Guebre-Egziabher**. An update on nutrition in chronic kidney disease. *J Int Urol Nephrol*. 2007,39:239-46
12. **F. Guebre-Egziabher**, D. Fouque. Body mass index, muscle and fat in chronic kidney disease : question about survival. D. Mafra, *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23-24:61-6
13. Fouque D, **Guebre-Egziabher F**. Do low protein diets work in chronic kidney disease patients ? *Seminars in Nephrology* 2009, 29: 30-38
14. Sophie Ignace, Denis Fouque, Walid Arkouche, Jean-Paul Steghens; **Fitsum Guebre-Egziabher**. Preserved residual renal function is associated with lower oxidative stress in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial transplant* 2009, 24:1685-9
15. **Fitsum Guebre-Egziabher**, Laurent Juillard, Yves Boirie, Martine Laville, Bernard Beaufrère and Denis Fouque. Short term administration of a combination of recombinant Growth Hormone and Insulin- like Growth Factor-1 induces anabolism and increases albumin synthesis in maintenance hemodialysis. *J Clin endoc metab* 2009, 94:2299-305.
16. Justine Bacchetta, Stéphanie Boutroy, **Fitsum Guebre-Egziabher**, Laurent Juillard, Jocelyne Draï, Solenne Pelletier, Anne Charrié, Marie Christine Carlier, Roland Chapurlat, Maurice Laville, Denis Fouque. The relationship between adipokines, osteocalcin and bone quality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial transplant* 2009, 24 : 3120-3125.
17. Denise Mafra, **Fitsum Guebre-Egziabher**, Christine Cleaud, Walid Arkouche, Anne Mialon, Jocelyne Draï, Denis Fouque. Obestatin and ghrelin interplay in hemodialysis patients. *Nutrition* 2009: doi 10.1016/j.nut.2009.09.003
18. Denise Mafra, **Fitsum Guebre-Egziabher**, Denis Fouque. Endocrine role of stomach in appetite regulation in chronic kidney disease : about Ghrelin and Obestatin. *Journal of renal nutrition* doi:10.1053/j.jrn.2009.08.002

19. **Guebre-Egziabher F**, Kalbacher E, Fouque D. [Insulin resistance and inflammation in chronic kidney diseases.]. *Nephrol Ther*. 2009 Jul;5 Suppl 5:S346-52..
20. Bacchetta J, Boutroy S, Vilayphiou N, Juillard L, **Guebre-Egziabher F**, Rognant N, Sornay-Rendu E, Szulc P, Laville M, Delmas PD, Fouque D, Chapurlat R. Early Impairment of Trabecular Microarchitecture Assessed With HR-pQCT in Patients With Stage II-IV Chronic Kidney Disease. *J Bone Miner Res*. 2009 Sep in press.
21. **Guebre-Egziabher F**, Juillard L, Kalbacher E, Bacchetta J, Fouque D. Inflammation and insulin resistance : chronic kidney disease features. *Nephrol Ther* 2010 6S1: S6-S12
22. Juillard L, **Guebre-Egziabher F**, Fouque D. What is the benefit of the new European recommendations for dialysis in nutrition? *Nephrol Ther* 2010, 6S1, S2-S6
23. Bacchetta J, Fargue S, Boutroy S, Basmaison O, Vilayphiou N, Plotton I, **Guebre-Egziabher F**, Dohin B, Kohler R, Cochat P. Bone metabolism in oxalosis: a single-center study using new imaging techniques and biomarkers. *Pediatr Nephrol*. 2010 Mar DOI 10.1007/s00467-010-1453-x
24. Arkouche Walid, **Guebre-Egziabher Fitsum**, Normand Sylvie, Juillard Laurent, Laville Martine, Laville Maurice, Fouque Denis. Lean mass dehydration in maintenance hemodialysis patients: a multi-component body composition analysis. Soumis *Nephrol Dial Transplant*

Communication dans des congrès internationaux

CO : communication orale

PO : communication affichée

1. Dépense énergétique et membrane de dialyse

Fitsum Guebre-Egziabher, F Combarous, M. Laville, D. Fouque. Octobre 1999: première réunion commune de la société de néphrologie et de la société francophone de dialyse, Lausanne. PO

2. Body composition, leptin, IGF-1 and insulin in chronic dialysis patients: a paraguayian study". Juillet 2000: congrès international de nutrition et rein "renal nutrition", Lyon. PO

3. Adiponectin in chronic renal failure patients. **Fitsum Guebre-Egziabher**, J. Bernhard, A. Hadj-Aissa, D. Fouque. Octobre 2002 : American society of nephrology, Philadelphie. PO

4. Régulation de la Fétuine en IRC modérée : rôle du débit de filtration glomérulaire

27 – 30 septembre 2005 : congrès de la Société de Néphrologie et la société française de dialyse, Clermont Ferrand. PO

5. The parathormone Ratio 1-84 /7-84 is positively regulated by serum phosphate but not GFR in stage III chronic kidney disease. Novembre 2005 : Congrès annuel American Society of Nephrology, Philadelphie. PO

6. Adipokines and bone biomarkers in CKD patients: the osteocalcin-adiponectin relationship Justine Bacchetta, **Fitsum Guebre-Egziabher**, Solenne Pelletier, Michel Richard, Jocelyne Draï, Maurice Laville, Denis Fouque

Novembre 2008, Congrès annuel American Society of Nephrology, Philadelphie. PO

7. Altered white adipose tissue cellularity and adipokine dysregulation in a rat model of chronic kidney disease

Emilie Kalbacher, Bader Zarrouki, Nicolas Pillon, Alain Geloën, **Fitsum Guebre-Egziabher**, Denis Fouque and Christophe Soulage. Novembre 2008, Congrès annuel American Society of Nephrology, Philadelphie. PO

8. Obestatin and ghrelin interplay with appetite in hemodialysis patients.

Denise Mafra, **Fitsum Guebre-Egziabher**, Christine Cleaud, W Arkouche, Jocelyne Draï and Denis Fouque.

Mai 2009 : World congress of Nephrology, Milan. PO

Liste des abréviations :

AA : acide arachidonique
ACC : acétyl coA carboxylase
AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments
AGPI : acides gras polyinsaturés
AGPI n-3 : acides gras polyinsaturés de la série n-3 ou oméga trois
ALA : acide linoléique
AMPK : AMP- activated protein kinase
C/EBP : CCAAT/ enhancer binding protein
CPT-1 : carnitine palmitoyltransferase
DHA : acide docosahexaénoïque
EPA : acide eicosapentaénoïque
FXR : farnesoid X receptor
GPX : glutathion peroxydase
HDL : High density lipoprotein
HNF-4 : hepatic nuclear factor-4
HOMA-IR : homeostasis model assessment- insulin resistance
IL-6 : interleukine 6
IRS-1 : insulin receptor substrate 1
JNK : c-Jun N-terminal kinase
LA : acide linoléique
LDL : low density lipoprotein
LXR- α : liver X receptor α
MMP : matrix metallo protease
MRC : maladies rénales chroniques
MT-2A : metallothionein 2A
NRF-1 : nuclear respiratory factor-1
PGC-1 : peroxysome-proliferator activated receptor cofactor-1
Pi3K : phosphatidyl inositol 3 kinase
PPAR : peroxysome-proliferator activated receptor
RBP4 : retinol binding protein 4
ROS : reactive oxygene species
SOD : superoxyde dismutase
SREBP-1 : sterol regulatory-element binding protein-1
TNF α : tumor necrosis factor α
TZD : Thiazolidinedione

Table des matières

1	Introduction.....	12
2	Métabolisme des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) et formation de métabolites actifs.....	12
3	Oméga trois : Déterminants et apports dans la population générale.	15
4	Bénéfice clinique et biologique métabolique des AGPI n-3	17
4.1	Cardiovasculaire.....	17
4.2	Syndrome métabolique.	18
4.2.1	Définition du syndrome métabolique.	18
4.2.2	Dyslipidémie.	19
4.2.3	Insulinorésistance.	19
4.2.4	Autre : Hypertension artérielle, stress oxydant.	19
4.2.5	ALA, EPA, DHA ? Et quelles doses ?	20
4.3	Inflammation.	21
5	Effet métabolique cellulaire des AGPI n-3.....	22
5.1	Au niveau du foie.....	22
5.2	Au niveau du muscle.	23
5.3	Au niveau du tissu adipeux.	24
5.3.1	Biologie et fonction sécrétrice du tissu adipeux.	24
5.3.2	Tissu adipeux : cible du traitement du syndrome métabolique.....	24
5.3.3	Tissu adipeux : cible de traitement par les AGPI n-3.	25
5.4	Effet immuno modulateur	27
6	Publication	28
6.1	Titre : Une intervention nutritionnelle visant à diminuer le rapport AGPI n-6/n-3 augmente les concentrations circulantes d'adiponectine et l'oxydation lipidique chez le sujet sain. 28	
6.2	Résumé	28
6.3	Article.....	29
7	Omega trois et maladie rénales chroniques	37
7.1	Les perturbations métaboliques au cours de maladie rénales.....	37
7.1.1	Syndrome métabolique.....	37
7.1.2	Inflammation chronique.....	39
7.2	Publication.....	40
7.2.1	Titre: L'adiponectine au cours de l'insuffisance rénale est plus liée aux perturbations métaboliques qu'à la perte de fonction rénale.	40
7.2.2	Résumé.....	40
7.2.3	Article.....	41
7.3	Oméga trois et maladies rénales chroniques	48
7.3.1	Déterminants et apports en oméga 3.....	48
7.3.2	Effet métabolique.....	48
7.3.3	Effet sur la progression de la maladie rénale	50
7.3.4	Prévention de thrombose d'accès vasculaire de dialyse	50
7.4	Publication.....	51
7.4.1	Titre : Effet-dose d'une supplémentation en huile de poisson sur l'inflammation et l'expression génique adipocytaire chez des patients insuffisants rénaux chroniques non dialysés. 51	
7.4.2	Résumé.....	51
7.4.3	Article.....	52

7.5	Autres résultats et discussion	80
8	Conclusions et perspectives	82
9	Références	83

1 Introduction

Les patients souffrant de maladies rénales chroniques (MRC) présentent une morbi-mortalité élevée principalement de cause cardio-vasculaire. En effet, en plus des facteurs de risque traditionnels comme la dyslipidémie, l'hypertension, ces patients présentent d'autres perturbations métaboliques avec un état inflammatoire chronique, un stress oxydant, une dysfonction adipocytaire et une insulino résistance qui sont présents dès les stades précoces de la maladie rénale chronique.

Les progrès énormes qui ont été réalisés au cours de ces dernières décennies concernant les techniques de dialyse ainsi que l'arsenal thérapeutique médicamenteux n'ont pas permis hélas d'améliorer significativement la survie de ces patients.

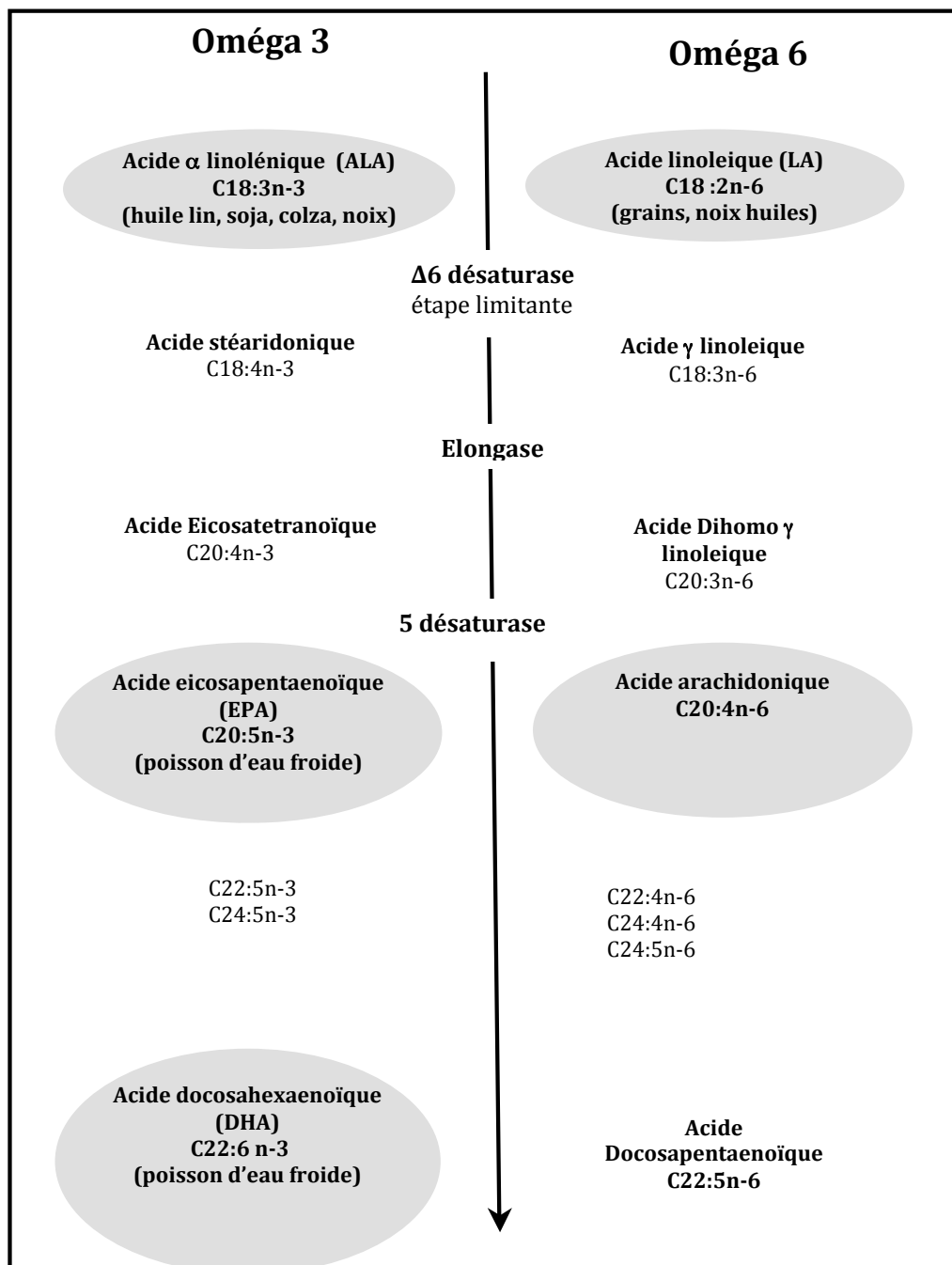
En modulant la composition et la structure des membranes cellulaires ainsi que les fonctions cellulaires et la synthèse de médiateurs lipidiques comme les eicosanoïdes, la supplémentation en acides gras polyinsaturés de la série n-3 (AGPI n-3) pourrait être bénéfique chez les patients ayant une MRC.

Dans la population générale, les oméga trois ont montré leur bénéfice au cours de maladies inflammatoires, cardio vasculaires, de l'hypertension artérielle et la dyslipidémie. Les données plus récentes montrent leur effet bénéfique en terme de modulation de fonction adipocytaire dans des modèles animaux de diabète et chez des patients diabétiques permettant ainsi de penser qu'ils pourraient avoir un bénéfice chez les patients insuffisants rénaux chroniques.

2 Métabolisme des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) et formation de métabolites actifs

Les oméga trois sont des acides gras essentiels. Les animaux et l'homme ne peuvent pas synthétiser les acides gras n-3 ou n-6, qui contiennent la première double liaison en 3 carbone ou 6 carbone de l'extrémité méthyle terminale de la molécule. La principale source de AGPI n-3 est le phytoplancton marin. Les précurseurs de synthèse de AGPI n-6 et n-3 chez l'animal sont l'acide linoléique (LA C18 :2 n-6) et l'acide α linoléique (ALA C18 :3 n-3) respectivement (figure 1).

Figure 1 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés



Les enzymes impliqués dans le métabolisme de ces deux acides gras sont les mêmes et il existe donc une compétition entre ces deux voies pour l'enzyme $\Delta 6$ désaturase qui est l'étape limitante. Un apport excessif en acide linoléique inhibe donc la formation d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA), le métabolisme de ALA étant moins efficace que celui de LA. Ainsi l'augmentation de l'apport en DHA et EPA apporte un bénéfice supplémentaire même si l'apport en ALA alimentaire est riche (1). Les recommandations nutritionnelles préconisent un ratio n-6/n-3 qui est représenté par le rapport LA/ALA d'environ 5/1 chez l'adulte (2, 3). Cependant le régime occidental est riche en n-6 et ce rapport est actuellement 15/1 selon les données de l'AFSSA (rapport oméga trois : acides gras de la famille oméga trois et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations 2001).

Les AGPI représentent les composants principaux des phospholipides membranaires. Chez l'homme, il faut en moyenne 2 mois après le début d'une supplémentation en DHA pour avoir un enrichissement stable des membranes cellulaires et avoir des effets biologiques. La plupart des effets des AGPI dépendent de la formation de leurs métabolites actifs : les eïcosanoïdes (figure 2) et d'autres médiateurs lipidiques comme les résolvines et protectines. Les eïcosanoïdes dérivés des AGPI n-3 ont en général un effet anti inflammatoire alors que ceux dérivés de AGPI n-6 sont plutôt pro inflammatoires (4). De plus, les résolvines et protectines qui sont une famille nouvellement découverte de médiateurs lipidiques dérivés de l'EPA et DHA et sont produits par différents tissus (foie, rein, cerveau etc..) ont une action locale anti inflammatoire et protectrice tissulaire (5, 6) en agissant via des récepteurs membranaires couplés aux protéines G.

Il est possible que par l'intermédiaire de ces médiateurs lipidiques, les AGPI n-3 diminuent l'inflammation systémique mais aussi l'état micro inflammatoire chronique au niveau du tissu adipeux au cours de l'obésité et le diabète (7, 8).

Figure 2 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés et formation de métabolites actifs

Figure 2 : Les AGPI sont localisés en position sn-2 des molécules de phospholipide. Les métabolites actifs comme les eicosanoides et autres médiateurs lipidiques sont formés après la libération des AGPI par l'action de phospholipase A2. La synthèse de PG et Tx dépend de la cyclo-oxygénase dont le substrat préféré est l'AA. Schéma repris de Yuriko Adkins, Darshan S ,Kelley. (9)

3 Oméga trois : Déterminants et apports dans la population générale.

- L'âge : l'activité des désaturases et élongases pourrait être altérée avec l'âge (12). Bolton et al ont montré chez l'homme la composition en AGPI du tissu adipeux est influencée par l'âge, indépendamment de la diététique.
- Le rapport n-6/n-3 peut également influencer la conversion de ALA par la compétition au niveau des voies enzymatiques.

Selon les dernières publications de l'AFSSA, les apports en oméga 3 de la population française sont insuffisantes avec un rapport LA/ALA supérieure à 10/1 pour un niveau recommandé à 5/1 (ref martin). Les apports nutritionnels conseillés en France sont pour l'acide linoléique de 2 et 1,6 g/j chez l'homme et chez la femme adulte respectivement. L'apport conseillé en DHA est de 0,12 et 0,10 g/j chez l'homme et la femme. Les recommandations américaines (Institute of Medicine of the National Academics) préconisent un apport de 1,6 et 1,1 g /j d'ALA chez l'homme et la femme respectivement (13). Les recommandations de l'American Heart Association (AHA) pour l'adulte sans antécédent sont : la consommation d'aliments riches en ALA et de poisson au moins deux fois par semaine (3). En présence de pathologie cardiovasculaire, l'AHA préconise une supplémentation de 1 g EPA+ DHA par jour.

Tableau 1 : Apport conseillé en oméga trois chez l'adulte.

	AFSSA	AHA	WHO
C 18:3 n-3 ALA	2 g/j (H) 1,6 g/j (F)	1,6 (H), 1,1 (F)	
C 20: 5 n-3 EPA		1 g/j DHA et EPA *	0,3-0,5 g/j DHA+ EPA
C 22:6 n-3 DHA	0,12 g /j (H) 0,10 g/j (F)		
Ratio n-6/n-3	5/1	5/1	

- * En présence de pathologies cardiovasculaires,
- AFSSA : agence française pour la sécurité et la santé alimentaire, AHA : american heart association, WHO : world health organization. H ; homme, F ; femme.

4 Bénéfice clinique et biologique métabolique des AGPI n-3

4.1 Cardiovasculaire.

Les bénéfices d'un apport en oméga trois en prévention secondaire cardiovasculaire est actuellement clairement établi (14). La supplémentation en AGPI n-3 sous forme d'huile de poisson chez des patients ayant fait récemment un infarctus du myocarde diminue sensiblement leur mortalité. Dans la plupart des études, les oméga 3 améliorent les paramètres cardiovasculaires et la mortalité globale (14, 15). Ce bénéfice n'est pas seulement lié à la correction de la dyslipidémie.

Un certain nombre d'études suggèrent que le bénéfice cardiovasculaire des oméga trois semble être sensiblement lié à leur effet anti arythmique. Dans une étude cas témoin, Siscovick et al ont montré une réduction de 50 % du risque d'arrêt cardiaque avec un apport de 180 mg d'EPA par jour correspondant à 1 à 2 part de poisson par semaine (15). L'étude Physician Health Study sur un suivi de 11 ans a quant à elle montré une réduction de 52 % du risque de mort subite mais pas du risque d'infarctus et de décès cardiaque non subit, suggérant que l'effet protecteur des oméga trois était lié à un effet anti arythmique (16). Mais il est possible également que les AGPI n-3 jouent un rôle dans la régression ou diminution de progression d'athérosclérose.

4.2 Syndrome métabolique.

4.2.1 Définition du syndrome métabolique.

Le syndrome métabolique correspond à un ensemble d'anomalies cliniques et métaboliques, l'insulinorésistance étant au centre de ces désordres physiopathologiques graves. Il existe plusieurs définitions dont celle proposée par l'Adult Treatment Program III (ATP III) du National Cholesterol Education Program (NCEP) (17), et plus récemment celle proposée par l'International Diabetes Federation en 2006 (18) qui semble la mieux validée sur la base de la prédiction du risque de diabète et de complication cardiovasculaire.

Tableau 2 : critères du syndrome métabolique (NCEP). Le syndrome métabolique est retenu lorsque 3 des 5 critères suivants sont présents chez un même individu

Tour de taille	> 88 cm chez la femme, > 102 cm chez l'homme
HDL-c	<0.50 g/l chez la femme < 0.40 g/l chez l'homme
Triglycérides à jeun	≥ 1.50 g/l
Pression artérielle	$\geq 130/85$ mmHg ou traitement
Glycémie à jeun	≥ 1.10 g/l

Tableau 3 : Critères du syndrome métabolique selon la définition de l'International diabetes federation.

Le syndrome métabolique est retenu en présence de :

Une obésité centrale définie par le tour de taille (TT), avec des valeurs spécifiques selon l'ethnicité : pour la population européenne $TT \geq 94$ cm chez l'homme et ≥ 80 cm chez la femme.

Associée à 2 des 4 critères suivants :

Elévation des Triglycérides	≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/L) ou traitement spécifique pour cette anomalie lipidique
Diminution du HDL cholestérol	< 40 mg/dl (1.03 mmol/L) chez l'homme et < 50 mg/dl (1.29 mmol/L) chez la femme ou traitement spécifique pour cette anomalie lipidique
Augmentation de la pression artérielle	Systolique ≥ 130 ou diastolique ≥ 85 mmHg Ou traitement d'une HTA diagnostiquée précédemment
Augmentation de la glycémie à jeun	≥ 100 mg/dl (5.6 mol/l) ou un diabète de type 2 précédemment diagnostiqué

4.2.2 Dyslipidémie.

Un des effets le plus spectaculaire des oméga trois est l'effet hypotriglycéridémiant. Ceci a été observé avec l'EPA, le DHA ou leur combinaison au cours de supplémentation en huile de poisson (19). Concernant le cholestérol, la majorité des études montrent une diminution du cholestérol total et une augmentation de HDL cholestérol, alors que l'effet sur le LDL cholestérol semble être sujet de controverse, avec en général augmentation du LDL cholestérol. Cependant le risque cardiovasculaire potentiel associé à cette augmentation est compensé par une diminution de la fraction de petites lipoprotéines denses (20).

4.2.3 Insulinorésistance.

Un certain nombre d'études chez l'animal montrent le rôle des AGPI n-3 dans la prévention de l'insulino résistance induite par un régime riche en graisse (21-24). Chez le sujet sain, Delarue et al ont montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie glucidique avec une supplémentation de 1,8 g d'EPA et DHA (25). Cependant, pour l'instant les études ayant explorées la correction de l'insulino résistance induite par un régime riche en graisse chez les animaux et sujets diabétiques sont contradictoires alors que l'effet hypolipémiant persiste (26-28).

4.2.4 Autre : Hypertension artérielle, stress oxydant et flexibilité métabolique.

Les AGPI n-3 ont également un effet bénéfique sur les autres composantes avec diminution modérée de pression artérielle, amélioration de la fonction endothéliale, diminution de l'activation plaquettaire et augmentation de la défense anti oxydant cellulaire (20, 29, 30).

Un certain nombre d'études permettent de penser que les oméga 3 auraient un effet sur la flexibilité métabolique. La flexibilité métabolique est la capacité de l'organisme à adapter l'oxydation des substrats selon leur disponibilité. Elle est représentée par la capacité de l'organisme à passer d'un état d'oxydation lipidique majoritaire à jeun à un état d'oxydation glucidique au cours d'une stimulation insulinique. La perte de cette capacité de passer de l'oxydation lipidique à l'oxydation glucidique définit l'inflexibilité métabolique. L'inflexibilité métabolique au niveau musculaire est actuellement reconnue à l'origine de l'accumulation de lipide intra myocytaire et l'insulinorésistance au cours du diabète et de l'obésité (31, 32). L'accumulation de lipides ou la baisse du turn-over des triglycérides peut induire une lipotoxicité via l'accumulation de céramides et diacylglycérol (33). In vitro, sur des myocytes provenant de quadriceps de sujets sains en culture, Ukropcova et al ont montré un effet variable du glucose sur la suppression de l'oxydation lipidique. Une résistance à la suppression de l'oxydation lipidique par l'hyperglycémie a été montrée reliée au sujets minces, sportifs et sensibles à l'insuline (34). Une augmentation de l'oxydation lipidique à jeun chez le sujet mince a été déjà décrite après une supplémentation en EPA et DHA ou une modification de régime afin de diminuer le rapport n-6/n-3 (35, 36). Sur des myotubes en culture, un prétraitement par de l'EPA, l'ALA ou DHA améliore la flexibilité métabolique des cellules qui sont exposées soit à un milieu riche en glucose ou en lipide (37).

4.2.5 ALA, EPA, DHA ? Et quelles doses ?

Le DHA semble être plus efficace par rapport à l'EPA sur l'effet sur le cholestérol, la pression artérielle, et endothéliale alors que l'effet semble similaire sur la production de cytokines et le stress oxydant (20). D'autres études laissent penser que l'EPA est probablement plus hypolipémiant que le DHA, de par son effet sur l'oxydation lipidique mitochondriale au niveau hépatique (38). Une étude chez l'homme ayant comparé l'effet métabolique d'un régime de 6 semaines riche en ALA (6,8 g/j) comparé à un régime riche en EPA+DHA (1,05 et 0,55 respectivement) montre l'absence de différence à part une augmentation de LDL cholestérol dans le groupe EPA + DHA. Mais la durée courte de l'intervention ainsi que la population ciblée (au delà de 65 ans) font les limites de cette étude. Il est admis qu'une supplémentation isolée en ALA permet d'augmenter la teneur en EPA cellulaire mais n'a pas d'effet sur le contenu en DHA. Il est donc plus raisonnable de

préconiser une modification de régime associant une augmentation de l'apport en ALA et un apport en poisson gras pour assurer un apport adéquat en DHA.

Alors que généralement les études d'intervention qui se sont intéressées à la correction de dyslipidémie ont utilisées des doses importantes de AGPI n-3, les études plus récentes montrent par contre le bénéfice apporté par des suppléments par de faibles doses de DHA. Ainsi Calzada et al avec une étude effet-dose ont montré chez les sujets sains qu'une supplémentation entre 200-800 mg par jour de DHA pendant 15 jours permet une diminution du MDA (malonedialdéhyde) plasmatique et de l'oxydabilité des LDL et l'absence de bénéfice supplémentaire avec des doses supérieures à 1 g par jour (39). Ce même groupe a montré un effet anti oxydant plaquettaire avec diminution de l'activation plaquettaire et de la phosphorylation de p38 MAPK associé à une diminution de l'isoprostane urinaire dont l'effet maximal intervient aux doses de 200 mg par jour de DHA (30). L'augmentation des doses au delà de 1 gramme a moins d'effet sur les plaquettes et un effet plutôt négatif sur le stress oxydant.

Il reste donc beaucoup de zones d'ombre sur les effets spécifiques des acides gras oméga trois in vivo et la relation de l'effet à la dose. S'il existe un certain nombre d'études de courte durée chez le sujet sain pour l'instant nous disposons de très peu de données au cours de situations pathologiques.

4.3 Inflammation.

Chez les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques, la production ou la concentration de cytokines pro inflammatoires est influencée par l'apport en AGPI n-3 dans un très grand nombre d'études. Les effets bénéfiques anti inflammatoires d'une supplémentation en AGPI n-3 a été ainsi montré au cours de la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, la bronchopneumopathie chronique obstructive (40). Un certain nombre de ces études suggère que l'effet local au niveau du site inflammatoire pourrait être plus prononcé par rapport à l'effet systémique et les marqueurs spécifiques de la maladie sont plus sensibles à cet effet immunomodulateur. Ceci suggère que la présence de tissu inflammatoire ou de cellules immunes sensibilisées au cours des désordres inflammatoires pourraient augmenter la sensibilité à l'effet immunomodulateur des AGPI n-3.

5 Effet métabolique cellulaire des AGPI n-3.

Les effets métaboliques des oméga trois sont très largement médiés par les PPAR (peroxysome-proliferator activated receptor). D'autres facteurs de transcription sont également impliqués comme SREBP-1 (sterol regulatory-element binding protein-1), HNF-4 (hepatic nuclear factor), LXR- α (liver X receptor α) et FXR (farnesoid X receptor) (41).

5.1 Au niveau du foie.

Les études épidémiologiques montrent que les sujets présentant une stéatose hépatique non liée à l'alcool consommaient moins de poisson gras (42). Par ailleurs le ratio n-6/n-3 est corrélé de façon significative avec la quantité de triglycéride hépatique (43). Une teneur faible en oméga trois est retrouvée chez les patients avec stéatose hépatique (44). Une nutrition parentérale avec des oméga trois prévient la stéatose et améliore les lésions de stéatose hépatique chez les souris obèses déficitaires en leptine (45, 46). Une diminution des triglycérides hépatiques est également retrouvée chez les souris ob/ob supplémentées en oméga trois. Il n'existe pas d'études randomisée, contrôlée en double aveugle chez l'homme ayant testée l'effet d'une supplémentation en oméga trois sur la stéatose hépatique. Caprani et al en utilisant une supplémentation de 12 mois par des AGPI n-3 à la dose de 1 g/j ont montré une baisse de la stéatose hépatique mesurée par échographie comparée aux sujets controls (47). Tanaka et al ont quant à eux utilisé une supplémentation en EPA à la dose de 2,7 g/j chez des patients ayant une stéatose confirmée par la biopsie hépatique pendant 12 mois et ont montré une amélioration du score échographique de stéatose avec preuve histologique chez 7 sujets ayant bénéficiée une deuxième biopsie hépatique à la fin de l'étude (48).

En régulant la transcription de gènes au niveau hépatique, les oméga trois pourraient être un traitement potentiel de la stéatose hépatique. PPAR α est un facteur de transcription connu pour diminuer la concentration de lipides plasmatiques. C'est un régulateur de synthèse des acides gras et augmente la β oxydation mitochondriale (49). Dans le modèle murin de stéatose hépatique, PPAR α est capable de prévenir la survenue et également d'améliorer les lésions de stéatose. Les oméga trois sont des activateurs de PPAR α au niveau hépatique (50). En plus de l'effet sur la stéatose hépatique, il semble que les oméga trois pourraient avoir un effet anti inflammatoire via la suppression de TNF- α et IL-6 médiée par PPAR α .

SREBP-1 est un facteur de transcription qui a un rôle important dans l'insulino résistance et un régulateur de synthèse des acides gras (51). Les AGPI n-3 inhibent la lipogénèse hépatique en diminuant la quantité de SREBP-1 mature nucléaire et inhibant ainsi son activité (52). L'effet activateur des oméga trois sur PPAR α et inhibiteur sur SREBP-1 pourrait être médié par l'activation de FXR (farnesoid X receptor) (53).

Par ailleurs les oméga trois inhibent la glycolyse en réprimant HNF-4 α (54) et également ChREBP-1 (carbohydrate response element binding protein-1) (55),

Une partie des effets métaboliques passe également par l'activation de AMPK (AMP activated protein kinase). L'AMPK est un métabolique « sensor », impliqué dans le contrôle du flux métabolique intra cellulaire et l'orientation vers l'oxydation lipidique ou la lipogénèse. L'AMPK activé inhibe la lipogénèse en phosphorylant l'acétyl coA carboxylase (ACC) qui est l'enzyme qui permet la formation de malonyl coA, l'étape d'initiation de la lipogénèse. Cette phosphorylation inhibe ainsi son activité et diminue la formation de malonyl coA qui est un inhibiteur de CPT-1 (carnitine palmitoyl transférase 1) qui est l'enzyme clé de β oxydation des acides gras. Ainsi, l'AMPK inhibe la lipogénèse et la néoglucogénèse hépatique et stimule l'oxydation lipidique.

L'activité d'AMPK est modulée par certaines adipokines comme la leptine (56) et l'adiponectine (57).

5.2 Au niveau du muscle.

Des niveaux bas d'AGPI n-3 au niveau des phospholipides membranaires du muscle squelettique sont associés avec une insulino résistance (58).

Le muscle squelettique qui est le site important de l'utilisation du glucose est impliqué dans l'effet insulino sensibilisateur des oméga trois (21). Les oméga trois diminuent les dépôts ectopiques intra myocellulaires de graisse. Au niveau moléculaire, ils préviennent la baisse de l'activité de phosphatidyl inositol 3 phosphate kinase (Pi3K) et du transporteur de glucose GLUT4 dans le muscle squelettique (59). Certaines études ont montré le possible rôle de SCD-1 (stearoyl-coA desaturase-1) dans l'effet métabolique des AGPI n-3 au niveau du foie et du muscle squelettique avec une répression de son expression (60). SCD-1 est impliqué dans la synthèse d'acides gras mono insaturés au niveau musculaire et hépatique et aussi dans la formation de céramides.

5.3 Au niveau du tissu adipeux.

5.3.1 Biologie et fonction sécrétrice du tissu adipeux.

Le tissu adipeux sécrète de nombreux peptides et protéines appelés « adipokines », qui jouent un rôle important dans l'homéostasie énergétique et la biologie vasculaire, ainsi que l'immunité et sont fondamentales dans la pathogénèse du syndrome métabolique. Les effets systémiques du tissu adipeux reflètent ses capacités de fonctionner comme organe endocrine, en intégrant les signaux hormonaux provenant de différentes régions du corps, en réponse à une modification de la balance énergétique, et en sécrétant un grand nombre d'adipokines agissant aussi bien sur le mode autocrine/paracrine et également systémique endocrine. Un certain nombre d'adipokines comme la leptine, l'adiponectine, l'omentine et visfatine exercent un effet anti diabétique (61).

5.3.2 Tissu adipeux : cible du traitement du syndrome métabolique.

Dans les années 1990, la description d'une augmentation de l'expression et de la sécrétion de TNF- α par le tissu adipeux chez le rongeur obèse a permis de mettre le lien entre inflammation –obésité et insulino-résistance (62). Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'insulino-résistance induite par TNF- α implique une phosphorylation en sérine de IRS-1 (insulin receptor substrate-1) médiée par JNK, qui inhibe la phosphorylation normale en tyrosine de IRS-1 et le signal insulinique (63).

Par ailleurs, 15-35% de l'interleukine 6 (IL-6) circulante pourrait également provenir de la production par le tissu adipeux chez l'homme (64). L'IL-6 pourrait être également impliquée dans l'insulino-résistance et ses complications (65).

La leptine qui est également une hormone sécrétée par le tissu adipeux agit au niveau central, en augmentant la sécrétion de peptides anorexigènes comme la proopiomélanocortine, et CRH (corticotrophin releasing hormone). Au niveau périphérique, elle stimule l'oxydation lipidique, l'utilisation de glucose et prévient l'accumulation de lipides (66). Ces actions pourraient impliquer l'activation d'AMPK (56, 67). Il existe une résistance à l'action de la leptine au cours de l'obésité (68).

L'adiponectine est une des hormones sécrétées par le tissu adipeux dont les concentrations diminuent avec l'augmentation de masse grasse (69), au cours de l'obésité, diabète de type 2

et de pathologies cardiovasculaires (70). Chez l'homme l'adiponectine circulante existe sous trois formes : trimère, hexamère, haut poids moléculaire (HMW). Seule l'adiponectine HMW semble être un marqueur de syndrome métabolique par rapport à l'adiponectine totale (71). De façon intéressante les Thiazolidinediones (TZD) augmentent également la forme HMW (72). Adipo R1 et R2 sont les deux récepteurs de l'adiponectine avec adipo R1 qui est plus lié à l'activation de la voie AMPK, alors que l'adipo R2 est plus impliqué dans l'activation de PPAR α (57, 73, 74) .

D'autres adipokines : résistine, RBP-4 sont également impliquées dans l'insulinorésistance.

MCP-1 ou monocyte chemoattractant protein 1 joue un rôle dans le recrutement des monocytes/macrophages au niveau du tissu adipeux. Les concentrations circulantes et au niveau du tissu adipeux de MCP-1 sont élevées chez l'obèse (75). Au cours de maladies métaboliques comme l'obésité, il existe une réorganisation du tissu adipeux avec un remodelage de la matrice extra cellulaire par des métalloprotéases (MMP) dont l'expression est augmentée. L'altération inflammatoire du tissu adipeux est à l'origine des complications associées à l'obésité comme le diabète, l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaires.

5.3.3 Tissu adipeux : cible de traitement par les AGPI n-3.

Le tissu adipeux pourrait être un important effecteur des effets de AGPI n-3 vu ses capacités de stockage des lipides sous forme de triglycérides. Comme pour le foie et le muscle, la composition en acides gras du tissu adipeux correspond à la composition en acides gras alimentaires (76).

5.3.3.1 Prévention de la croissance et prolifération des adipocytes

La masse de tissu adipeux peut augmenter soit par l'intermédiaire d'une prolifération soit par hypertrophie des cellules adipeuses. Pendant la différenciation, les cellules souches pluripotentes donnent des cellules mésenchymateuses multipotentes, des préadipocytes et des cellules adipeuses matures (77). Les facteurs de transcription PPAR et C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) ont un rôle clé dans la différenciation adipocytaire (77). In vitro, Le DHA inhibe la différenciation adipocytaire et induit l'apoptose des préadipocytes

(78). Chez la souris soumise à un régime riche en lipide, la substitution de 9 % des acides gras du régime par de l'EPA/DHA prévient l'accumulation de graisse avec une diminution préférentielle des dépôts abdominaux (60, 79). Hubert J et al ont également montré que, la supplémentation en AGPI n-3 prévient l'augmentation de taille des adipocytes chez les souris db/db (qui ont une mutation du récepteur de la leptine) soumises à un régime riche en graisse (80).

5.3.3.2 Modulation du métabolisme adipocytaire et de la synthèse des adipokines

L'EPA, DHA et certains eicosanoides modulent l'expression de gènes au niveau adipocytaire par l'intermédiaire de facteurs de transcription. Une des cibles importantes est PPAR γ , qui se lie non seulement aux médiateurs lipidiques mais également aux thiazolidinediones (81). Après la liaison à son ligand, PPAR γ stimule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire, le transport des acides gras et les gènes impliqués dans la lipogenèse. PPAR α et β peuvent également être activés au niveau adipocytaire entraînant ainsi une oxydation lipidique au niveau mitochondrial et peroxysomal (41). Ainsi l'augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau adipocytaire au cours d'un régime riche en AGPI n-3 pourrait contribuer à leur effet anti obésogène et à la diminution de la taille des adipocytes. Mais cet effet n'est pas associé à une augmentation de captation des acides gras par le tissu adipeux.

L'activation d'AMPK et SCD-1 peut être aussi impliqué dans les effets des AGPI n-3 sur le tissu adipeux. Chez la souris, l'administration d'EPA et DHA au cours d'un régime riche en lipide, entraîne l'augmentation de l'expression de protéine mitochondriale (60) avec une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale comme PGC-1, NRF-1 et PPAR γ . Les TZD aussi induisent la biogénèse mitochondriale au niveau du tissu adipeux mais contrairement aux AGPI n-3, les TZD induisent la croissance du tissu adipeux (82), permettant de penser que des mécanismes multiples et distincts sont impliqués dans l'effet des AGPI n-3 et TZD. En activant PPAR γ dans les adipocytes les oméga trois pourraient redistribuer les dépôts lipidiques du foie et muscle vers le tissu adipeux sous cutané. Cette redistribution de la graisse pourrait diminuer la teneur en diacylglycérol dans le foie et muscle et améliorer ainsi la sensibilité à l'insuline de ces organes.

L'autre mécanisme d'action des AGPI n-3 est la modulation de l'inflammation locale adipocytaire. Chez la souris db/db, la supplémentation en AGPI n-3 au cours d'un régime

riche en graisse permet de diminuer l'infiltration macrophagique, l'inflammation (diminution de l'expression des gènes de JNK, CD68, CD14, et MCP-1) (7). Avec ce même type de supplémentation Huber j et al ont montré une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la dégradation et production de la matrice extra cellulaire (MMP12, MMP14) ainsi qu'une diminution de l'infiltration macrophagique (80). Chez l'homme, une supplémentation en huile de poisson entraine la diminution de taille des adipocytes (8). Comparés aux adipocytes de grande taille, les petits adipocytes sont plus insulinosensibles, moins lipolytiques, relarguent moins de cytokines pro inflammatoires et secrètent plus d'adiponectine (82).

Concernant la sécrétion d'adiponectine, les études in vitro sont discordants avec absence d'effet des AGPI sur l'expression et sécrétion d'adiponectine sur des 3T3 en culture (83) mais une autre équipe a montré l'existence d'un effet stimulant sur la sécrétion d'adiponectine avec un effet plus important de DHA par rapport à l'EPA. Chez le rongeur l'apport d'huile de poisson au cours d'un régime riche en lipide entraine une augmentation d'adiponectine et de normaliser les concentrations de leptine et triglycéride (24, 84). Par ailleurs, chez la souris sous régime riche en lipide l'apport en AGPI n-3 induit la sécrétion d'adiponectine et cet effet est bloqué par un antagoniste de PPAR γ (83) alors que cet effet est conservé chez la souris invalidée pour PPAR α . Une étude clinique a également montré une augmentation de l'adiponectine après un apport simultané de DHA et EPA chez des patients en surpoids soumis à un programme de perte de poids, l'effet étant plus marqué à six mois par rapport à trois mois (26). Cependant dans cette étude il était difficile de distinguer l'effet propre des AGPI n-3 par rapport à la perte de poids. Une autre étude avec un apport en EPA de 1.8 g par jour pendant trois mois chez des sujets obèses a montré une augmentation de l'adiponectine (85).

Les effets sur les autres adipokines sont plutôt conflictuels. Ainsi Rossi et al ont montré que l'apport de AGPI n-3 prévient la baisse de leptine liée à un régime riche en saccharose (84).

Nous avons nous même montré chez des volontaire sains, qu'une modification de l'alimentation en augmentant l'apport en n-3 et diminuant celui des n-6 permet d'augmenter l'adiponectine de diminuer TNF- α (36) associé à une augmentation de l'oxydation lipidique.

5.4 Effet immuno modulateur

Un nombre important d'études montre que la production de cytokines proinflammatoires chez le sujet sain peut être diminuée par l'augmentation de l'apport d'EPA+ DHA. Ces évidences sont apportées par les études ex vivo mesurant la production de cytokines IL-6, TNF par des cellules mononuclées. Cependant pour l'instant la dose optimale d'AGPI ayant l'effet immunomodulateur optimal est loin d'être connue. Deux études ouvertes, non contrôlées montrant même un effet dose réponse en forme de « U » entre AGPI n-3 et la production d'IL-6 (86, 87), l'inhibition maximale de la production d'IL-6 ayant lieu avec les doses de 1-2 g d'AGPI n-3. Des résultats similaires sont également rapportés concernant la production de TNF- α .

Alors que l'effet métabolique de supplémentation en huile de poisson a été largement étudié chez le sujet sain, très peu d'études se sont intéressées à l'effet métabolique d'une modification globale de l'alimentation avec diminution du ratio n-6/n-3. C'est ce que nous avons essayé de faire dans ce travail.

6 Publication

6.1 Titre : Une intervention nutritionnelle visant à diminuer le rapport AGPI n-6/n-3 augmente les concentrations circulantes d'adiponectine et l'oxydation lipidique chez le sujet sain.

Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects.

Fitsum Guebre-Egziabher, Rémi Rabasa-Lhoret, Fabrice Bonnet, Jean-Philippe Bastard, Michel Desage, Michael R. Skilton, Hubert Vidal, Martine Laville. Eur J Clin Nutr 2008, 62 :1287-93

6.2 Résumé

Nous avons étudié 17 sujets témoins ayant une alimentation occidentale pauvre en AGPI n-3, non obèses, avec une intervention nutritionnelle de 10 semaines visant à diminuer leur rapport en acides gras poly insaturés n-6/n-3 pour atteindre les recommandations pour la population française qui est de 4-5/1. Pour cela des conseils diététiques leur ont été prodigués par une diététicienne du centre de recherche en nutrition humaine Rhône Alpes leur recommandant d'augmenter leur consommation de poisson à trois fois par semaine (poisson

gras pour avoir un apport quotidien en EPA et DHA de 1.2 g par jour), d'utiliser de l'huile de Colza pour la salade (pour assurer un apport en acide linoléique ALA de 1.7 g par jour) et de remplacer l'huile de cuisson par de l'huile d'olive afin de limiter l'apport des oméga 6. Nous avons étudié au début et 10 semaines après l'intervention nutritionnelle, leur paramètre anthropométrique, leur dépense énergétique par calorimétrie indirecte, leur sensibilité à l'insuline par clamp euglycémique hyperinsulinique, les marqueurs de l'inflammation (CRP, cytokines : tumor necrosis facteur TNF et interleukine IL-6) et les marqueurs de fonctions adipocytaire comme la leptine et adiponectine. La compliance au régime était mesurée par une enquête diététique sur 3 jours (deux jours de semaine et un jour de week end) et également par le profil en acides gras des membranes érythrocytaires.

Dans cette étude, nous avons montré que :

- Que de simples recommandations nutritionnelles permettaient d'atteindre les objectifs des recommandations nutritionnelles concernant l'apport en acides gras polyinsaturés.
- Que cette modification qualitative de l'alimentation s'accompagne d'une augmentation de la teneur AGPI n-3 des phospholipides membranaires
- Que cette intervention s'accompagnait d'une baisse du LDL cholestérol, d'une augmentation de l'oxydation lipidique sans modification de la sensibilité à l'insuline, d'une augmentation des concentrations d'adiponectine sérique et une diminution des concentrations plasmatiques de TNF- α , ceci sans modification de la composition corporelle.

Ce type d'intervention pourrait donc avoir un effet bénéfique dans les situations pathologiques d'insulino résistance, inflammation et dyslipidémie en améliorant le profil métabolique et inflammatoire des patients.

Cependant, avec cette intervention nutritionnelle il était impossible de démontrer que ce bénéfice était lié à la seule modification qualitative de l'apport en acides gras polyinsaturés n-3 car elle s'accompagne d'une augmentation de l'apport en AG mono insaturés et d'une diminution des acides gras saturés. Mais finalement ces dernières modifications sont également celles recherchées dans les recommandations nutritionnelles. Par ailleurs l'augmentation d'oxydation lipidique chez le sujet sain après supplémentation en huile de poisson a déjà été rapportée par Couet et al (35).

6.3 Article

ORIGINAL ARTICLE

Nutritional intervention to reduce the $n-6/n-3$ fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects

F Guebre-Egziabher^{1,4}, R Rabasa-Lhoret^{1,5,4}, F Bonnet¹, J-P Bastard^{2,3}, M Desage¹, MR Skilton¹, H Vidal¹ and M Laville¹

¹Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) Rhône-Alpes, Univ de Lyon, F-69008; INSERM U 870, F-69008; INRA 1235, F-69008; Univ Lyon 1, F-69003, INSA Lyon RMND F-69621, France; ²Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Biochimie et Hormonologie, Paris, France and ³INSERM U-680, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Background/Objectives: Consumption of $n-3$ polyunsaturated fatty acids (PUFA) has a favourable impact on inflammation and cardiovascular disease. However, the Western diet is characterized by a low $n-3$ PUFA intake and an imbalance in the $n-6/n-3$ PUFA ratio. Study the effect 10-week of diet modification to decrease the $n-6/n-3$ PUFA ratio on cardiovascular risk factors and resting energy expenditure.

Subjects and methods: Ten-week dietary intervention in 17 healthy subjects. Dietary intake, euglycemic hyperinsulinemic clamp, indirect calorimetry, lipid profile, hormones, inflammatory markers and erythrocyte membrane fatty acid composition were recorded before and at the end of the intervention. Comparisons are between baseline and post-treatment levels.

Results: Dietary records of the linoleic acid/ α -linolenic acid ratio (baseline: 32.2 (s.d. 3.7) vs post-intervention: 2.2 (s.d. 0.1), $P < 0.0001$) and erythrocyte membrane fatty acid composition reflected good compliance. Dietary intervention was associated with significant reductions in TNF- α (baseline: 2.2 (s.d. 0.3), post-intervention: 1.5 (s.d. 0.3) pg/ml, $P = 0.01$) and low-density lipoprotein-cholesterol (baseline: 2.5 (s.d. 0.2), post-intervention: 2.3 (s.d. 0.1) mmol/l, $P = 0.03$) and increased adiponectin (baseline: 6.5 (s.d. 0.7), post-intervention: 7.6 (s.d. 0.6) μ g/ml, $P = 0.02$). Fasting lipid oxidation was increased (baseline: 0.7 (s.d. 0.1), post-intervention: 0.9 (s.d. 0.1) mg/kg.min, $P = 0.01$), whereas glucose oxidation decreased in both fasting (baseline: 1.6 (s.d. 0.1), post-intervention: 1.3 (s.d. 0.1) mg/kg.min, $P = 0.02$) and hyperinsulinaemic conditions (baseline: 3.6 (s.d. 0.1), post-intervention: 3.3 (s.d. 0.1) mg/kg.min, $P = 0.04$). Insulin sensitivity was not affected by the intervention.

Conclusion: A decreased $n-6/n-3$ PUFA ratio can be achieved with simple dietary counselling, resulting in multiple, potentially favourable effects on the metabolic and inflammatory profiles.

European Journal of Clinical Nutrition advance online publication, 8 August 2007; doi:10.1038/sj.ejcn.1602857

Keywords: $n-3$ PUFA; dietary intervention; fatty acid oxidation; adiponectin; TNF- α

Introduction

Over the last century, there has been a large increase in the consumption of $n-6$ polyunsaturated fatty acids (PUFA), such that in the Western diet the ratio of $n-6$ to $n-3$ fatty acids is $\approx 20-30:1$, instead of the recommended range of $\approx 4-5:1$ (Krauss *et al.*, 2000; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Recommendations for increased intake of $n-3$ fatty acids are based on their potential health benefits against cardiovascular disease including reduced mortality (GISSI-Prevenzione Investigators, 1999; Simopoulos, 1999; Connor, 2000; Albert *et al.*, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Considering the evidence linking the progression of arteriosclerosis with

Correspondence: Professor M Laville, Hôpital Edouard Herriot, 3 place d'Arsonval, 69437 Lyon, France.

E-mail: Martine.laville@chu-lyon.fr

⁴These two authors contributed equally to this work.

⁵Present address: Laboratoire des dysfonctions métaboliques, Département de nutrition, Université de Montréal, and the Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, Montréal, Québec, Canada. Contributors: FG-E: Data collection/interpretation and manuscript. RR-L: Data collection/interpretation and manuscript. FB: Manuscript. J-PB: Data collection and manuscript revision. MD: Data collection and manuscript revision. MRS: Manuscript revision. HV: Study design and manuscript revision. ML: Study design and supervision, and manuscript revision.

Received 23 January 2007; revised 13 June 2007; accepted 20 June 2007

lipid abnormalities and chronic inflammation, *n*-3 PUFAs may play an important preventive role via the modulation of these pathways (Pai *et al.*, 2004). Population-based studies have suggested a relationship between *n*-3 PUFA consumption and protection against cardiovascular events and coronary heart disease (Iso *et al.*, 2006). Beneficial effects for metabolic disorders such as obesity, insulin resistance and type 2 diabetes are speculative, but are supported by recent studies suggesting that *n*-3 PUFAs serve as important mediators of gene expression, potentially via peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and/or sterol regulatory element-binding protein-1 (Simopoulos, 1999; Connor, 2000; Clarke, 2001; Summers *et al.*, 2002; Uкроpec *et al.*, 2003; Delarue *et al.*, 2004). In most but not all cases, *n*-6 PUFA have opposite effects to those of *n*-3 PUFA. They also inhibit the formation of EPA (eicosapentaenoic acid, 20:5, *n*-3 PUFA) and DHA (docosahexaenoic acid, 22:6, *n*-3 PUFA) and their incorporation into cell membrane phospholipids (Gerster, 1998).

Thus, a critical issue that must be addressed is how to effectively implement dietary recommendations for *n*-3 fatty acids. Furthermore, do such recommendations have measurable effects? Up to now, most studies have used fish oil supplementation, which is unlikely to be suitable for lifetime daily consumption and could have deleterious effects at very high doses (Simopoulos, 1999; Connor, 2000; Nettleton and Katz, 2005). Perhaps, a more suitable way to increase *n*-3 fatty acid intake is to include 3–4 fatty fish meals in the weekly diet along with 20 g of vegetable oil rich in α -linolenic acid (ALA) (Kris-Etherton *et al.*, 2000). Ideally, this should be combined with a reduced intake of *n*-6 PUFA (Gerster, 1998). To our knowledge, the effects of simultaneously increasing dietary intake of *n*-3 fatty acids and decreasing *n*-6 fatty acid intake have not been studied previously.

We hypothesized that increased *n*-3 PUFA consumption combined with a reduction in *n*-6 PUFA would have favourable outcomes. The objectives of this study were to assess the effects of this dietary modification on lipid, inflammatory and hormonal profiles, insulin sensitivity as well as resting energy expenditure in healthy subjects. The secondary objective was to investigate if appropriate intake and ratios of *n*-6/*n*-3 fatty acids could be achieved with simple dietary advice.

Subjects and methods

Subjects

Seventeen healthy subjects were recruited (10 males and 7 females; mean age 27.1 years (s.d. 1.9); mean body mass index (BMI) 22.4 kg/m² (s.d. 0.4)) through an advertisement for a dietary intervention study. The main inclusion criteria were: no first- or second-degree relatives with diabetes mellitus or obesity, BMI 20–25 kg/m², age 18–60 years and a low usual intake of *n*-3 fatty acids (less than one fish meal

per week, no intake of rapeseed, soya and walnut oil). None of the subjects had a history of hyperlipidaemia or inflammatory disease, and all were apparently healthy, as indicated by medical questionnaire, physical examination and routine laboratory analyses completed at enrolment. All subjects gave their written consent after being informed of the nature and purpose of the study as well as possible risks. The experimental protocol was approved by the ethics committee of Hospices Civils de Lyon and performed according to French legislation (Huriet law).

Diet and experimental design

The protocol consisted of a 10-week dietary intervention. The foods and ingredients selected for the diet were designed to increase the dietary content of *n*-3 fatty acids and to decrease *n*-6 fatty acids. Rapeseed oil was supplied with a daily intake of 20 ml (1.7 g/day of ALA). The study subjects were also instructed to augment their fish consumption to three fish meals per week ($\approx$ 100 g of salmon, tuna, mackerel, herring and sardines) in place of their habitual meat intake, providing a mean of 1.25 g/day of EPA and DHA. Advice was provided by a trained dietician twice before the dietary intervention and again after 1 month regarding the avoidance of foods containing high amounts of *n*-6 PUFA, vegetable oils (except rapeseed and olive) and their derivative products (potato chips, certain nuts and so on). Special emphasis was placed on qualitative but not quantitative modification of their habitual diet.

All subjects were given written and verbal instructions by a dietician on how to complete a 3-day (2 weekdays and 1 weekend day) dietary record before the initiation and during the last week of the dietary intervention. They also kept a food diary with daily rapeseed oil and fish intake. PUFA intakes were calculated using food composition tables specific to our country (CIQUAL table) (Deharveng *et al.*, 1999).

Advice was given on maintaining a constant physical activity level throughout the study.

The subjects underwent 2 days of testing before and at the end of the dietary intervention, including anthropometric measurements, blood samples, body composition and insulin sensitivity measurements. Each participant was invited to the Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Lyon (CRNH), Hôpital Edouard Herriot, for a comprehensive series of tests following a 10-h overnight fast. After anthropometric measurements, catheters were installed to infuse D₂-Glucose and to collect blood samples. Blood was drawn for the determination of fasting lipid, hormone and inflammatory profiles and erythrocyte membrane fatty acid composition, along with baseline clamp data. The resting metabolic rate was measured before and at the end of the clamp.

Weight and body composition

Body weight was recorded with the subject wearing no shoes and light clothing to the nearest 0.1 kg with an electronic

scale. Height was measured to the nearest 0.5 cm. The waist/hip ratio was calculated. Body composition was determined with a single-frequency bioelectrical impedance device (Star 50, Spengler, Cachan, France).

Euglycaemic hyperinsulinaemic clamp and indirect calorimetry

All patients underwent a 3-h euglycaemic hyperinsulinaemic (EH) clamp as described previously (Ducruzeau *et al.*, 2001). An antecubital vein was cannulated for infusion of D₂-Glucose (6,6-²H₂-glucose; Eurisotop, St-Aubain, France), 20% dextrose and insulin (Actrapid, Novo-Nordisk, Copenhagen, Denmark). The other arm was cannulated for blood sampling. A primed-constant infusion of D₂-Glucose was begun 3 h before the start of insulin infusion to ensure isotopic equilibrium. After completion of the 3-h isotopic equilibration period, insulin was infused at the rate of 40 mU/kg.min for 180 min. Plasma glucose was measured every 10 min with a glucose analyser (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) and maintained at a fasting level with a variable infusion rate of 20% dextrose. Blood was drawn each 10 min for the last 30 min of isotopic equilibrium, and EH clamp was undertaken for the determination of 6,6-²H₂-glucose isotopic enrichment, plasma glucose, insulin, free fatty acids, triacylglycerol and glycerol. Insulin sensitivity was calculated from the mean of four values obtained over 30 min (Rabasa-Lhoret *et al.*, 2003).

Continuous indirect calorimetry was performed with a ventilated hood system (Deltatrac, Datex Instruments Corp., Helsinki, Finland) during the last 60 min of tracer equilibrium and the EH clamp periods, for the measurement of carbohydrate and lipid oxidation rates (Laville *et al.*, 1995).

Erythrocyte membrane fatty acid composition

Erythrocytes were obtained from a 4 ml blood sample collected in a tube containing 54 µl of EDTA 77 mM and centrifuged for 20 min at 200 g and 4°C. The upper fraction rich in platelets was removed and the remaining lower fraction was treated with 1 ml NaCl 9% and 1 ml of EDTA. A volume of 1 ml Dextran 5% was added and the tube was left to settle at lab temperature. The base was then washed successively with 1 ml of a Tyrode Hepes buffer at pH 7.4 and 2 × 1 ml of NaCl 9%. An additional centrifugation at 1800 g for 10 min isolated erythrocytes, and 40 µl of BHT 1 mM was added to avoid PUFA oxidation.

Heptadecanoic acid was added as an internal standard and lipids from this fraction were extracted by the method of Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959), followed by transesterification with BF₃-methanol at 100°C. The crude fatty acid methyl ester (FAME) mixture was purified by thin-layer chromatography (hexane, diethyl ether, acetic acid, 80:20:1). The FAME spot scraped from silica was reconstituted in 250 µl of trimethylpentane. Chromatographic separation of FAME was achieved with a capillary column (HP Innnowax 60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) after a 1-µl pulsed, splitless injection (splitless time: 1 min; pulse pressure: 35 psi). Helium was

used as a carrier gas at a constant flow rate of 1.2 ml/min (24 psi at 90°C). Oven temperature was started at 90°C for 1 min, then raised to 175°C at 15°C/min, followed by a 5°C/min increase to 225°C (10 min), and finally up to 255°C at 10°C/min and maintained at this temperature for 10 min. Electron impact mass spectrometry was undertaken in an HP5973 MSD (Agilent Technologies, Massy, France) working at 70 eV, in full-scan detection for fatty acid profiles. Fatty acids were measured against one calibration point from a standard mixture of the most important components from Supelco (Sigma Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) relative to heptadecanoic acid methyl ester.

Laboratory analyses

Plasma glucose was quantified by the glucose oxidase method (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), and free fatty acids were measured by the colorimetric enzymatic method (Wako Pure Chemical Industry, Neuss, Germany). Plasma triacylglycerols, glycerol and beta-hydroxybutyrate were analysed according to enzymatic methods (Laville *et al.*, 1995).

Plasma isotopic enrichment of 6,6-²H₂-glucose was assessed by gas chromatography–mass spectrometry (HP 5971 MSD, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), and glucose turnover rates were calculated by steady-state equations (Laville *et al.*, 1995).

The serum concentrations of leptin, adiponectin, tumour necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) were measured in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (with Quantikine leptin, Quantikine high sensitivity TNF-α and Quantikine IL-6, kits from R&D Systems, Oxford, UK, and adiponectin kit from BioCat, Heidelberg, Germany). Plasma insulin was quantified in duplicate by radioimmunoassay (Ins Irma, Kip 1251, MDS Nordion, France). C-reactive protein (CRP) was assessed by immunonephelometry in an IMAGE analyser (Beckman-Coulter, Villepinte, France).

Statistical methods

All values are presented as mean (s.d.). Paired *t*-tests and the Wilcoxon rank test were performed for comparisons between final and baseline values or percentage variations from baseline when applicable. Data analyses were undertaken using Statview statistical software program (Statview, version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Subjects and diet diaries

The anthropometric and body composition values of the study subjects did not change significantly during the period of the trial, and there were no subject withdrawals (Table 1).

Table 1 Characteristics of subjects at baseline and after 10 weeks of dietary intervention

	Baseline (n = 17)	10 weeks (n = 17)	P-value
Weight (kg)	67.2 (9.2)	67.5 (2.2)	0.81
BMI (kg/m ²)	22.4 (1.8)	22.5 (1.9)	0.38
Hip/waist ratio	0.85 (0.10)	0.85 (0.10)	0.84
Fat mass (%)	24.4 (7.3)	24.1 (7.2)	0.62

Abbreviation: BMI, body mass index.
Data presented as mean (s.d.).

Table 2 Daily intake of energy, protein, fat and carbohydrates at baseline and after 10 weeks of dietary intervention

	Baseline (n = 17)	10 weeks (n = 17)	P-value
Energy (kcal/day)	2117 (616)	2015 (495)	0.82
Carbohydrate (% cal)	44.7 (4.8)	44.2 (6.9)	0.73
Protein (% cal)	15.7 (2.5)	16.9 (2.8)	0.27
Fat (% cal)	39.6 (4.0)	38.9 (6.4)	0.64
Saturated fatty acids (g/l)	32.7 (10.4)	26.4 (7.0)	0.02
MUFA	28.5 (9.9)	35.8 (7.1)	0.004
PUFA	16.4 (4.6)	14.2 (5.5)	0.02
LA	9.8 (2.6)	8.9 (0.4)	<0.0001
ALA	0.36 (0.20)	2.62 (0.40)	<0.0001
LA/ALA	32.2 (15.4)	2.2 (0.3)	<0.0001

Abbreviations: ALA: α -linolenic acid; LA: linoleic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.
Data presented as mean (s.d.).

Dietary intake was estimated by analysing the diet diaries before and during the last week of the dietary intervention. Initial intake met the inclusion criteria (high $n-6$ PUFA intake, low $n-3$ PUFA intake, linoleic acid (LA)/ALA ratio: 32.2 (s.d. 15.4), Table 2). Compliance with the dietary intervention was good, with no modification of energy and constant macronutrient intake. During the intervention, subjects markedly increased their fish intake (22.9 ± 11 vs 305.41 g/week, $P=0.0003$).

As expected, ALA intake increased significantly and LA intake decreased, lowering the LA/ALA ratio to 2.2 (s.d. 0.3) ($P<0.0001$). The high percentage of oleic acid (63% of C18:1) in rapeseed oil explains the significant elevation of monounsaturated fatty acids (MUFA). The dietary intervention was also associated with a significant reduction in saturated fat intake (Table 2).

Total fatty acid composition was ascertained in the erythrocyte membranes in all subjects. After 10 weeks of dietary intervention, EPA (C20:5 $n-3$ PUFA) rose significantly from 0.96 to 1.50% ($P=0.008$), with a concomitant increase in the $n-3/n-6$ PUFA ratio from 0.25 to 0.33 ($P=0.01$). No concomitant change in the content of $n-6$ fatty acids was apparent in erythrocytes (Table 3).

Hormonal and inflammatory profiles

Mean plasma adiponectin rose significantly after the 10-week diet (baseline: $6.50 \mu\text{g/ml}$ (s.d. 0.70) vs post-intervention:

Table 3 Fatty acids in erythrocyte phospholipids at baseline and after 10 weeks of dietary intervention

Fatty acids	Baseline (n = 17)	10 weeks (n = 17)	P-value
% of total fatty acids			
$n-9$			
18:1	12.71 (2.35)	12.74 (2.33)	0.82
$n-6$			
18:2	11.54 (3.82)	10.11 (1.67)	0.20
20:4	16.84 (4.99)	16.74 (3.68)	0.65
$n-3$			
18:3	0.13 (0.10)	0.17 (0.10)	0.09
20:5	0.96 (0.36)	1.50 (0.79)	0.008
22:6	6.23 (2.14)	7.55 (2.81)	0.06
$n-3/n-6$	0.25 (0.09)	0.33 (0.13)	0.01

Data presented as mean (s.d.).

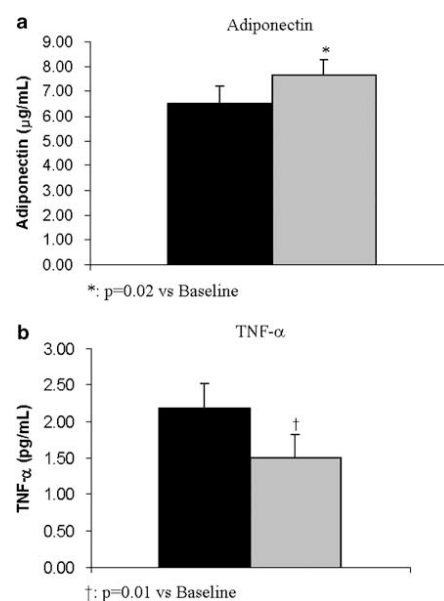


Figure 1 : Changes in (a) serum adiponectin ($\mu\text{g/ml}$), and (b) TNF- α (pg/ml) at baseline and at the end of the 10-week dietary intervention. ■ Baseline. □ After 10 weeks. * $P=0.02$ vs Baseline. † $P=0.01$ vs baseline.

$7.63 \mu\text{g/ml}$ (s.d. 0.62), $P=0.02$, Figure 1a). Plasma leptin concentration was in the normal range, and did not change significantly (9.16 ng/ml (s.d. 2.58) vs 8.39 ng/ml (s.d. 2.79), respectively). Plasma TNF- α concentration declined significantly after 10 weeks (2.18 pg/ml (s.d. 0.34) vs 1.50 pg/ml (s.d. 0.32), $P=0.01$, Figure 1b), whereas the decreases in IL-6

(1.28 pg/ml (s.d. 0.23) vs 1.00 pg/ml (s.d. 0.17)) and CRP (0.23 mg/l (s.d. 0.09) vs 0.17 mg/l (s.d. 0.04)) concentrations were not statistically significant.

Lipid profile

In the fasting state, the diet induced a significant reduction in low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, whereas there was a non-significant reduction in total cholesterol and glycerol (Table 4). No significant differences were observed under hyperinsulinaemic conditions (Table 5).

Substrate utilization, glucose homeostasis and insulin sensitivity

The resting metabolic rate was not affected by the dietary intervention (data not shown). However, the 10-week programme had a substantial effect on substrate utilization. For example, in the fasting state the lipid oxidation rate increased significantly (0.7 mg/kg.min (s.d. 0.3) vs 0.9 mg/kg.min (s.d. 0.3), $P=0.01$), whereas the glucose oxidation rate decreased (1.6 mg/kg.min (s.d. 0.4) vs 1.3 mg/kg.min (s.d. 0.4), $P=0.02$, Table 4). Neither fasting glucose nor plasma insulin was affected by the dietary intervention (Table 4).

At the end of the EH clamp, the decrease in the glucose oxidation rate remained statistically significant (3.6 mg/kg.min (s.d. 0.7) vs 3.3 mg/kg.min (s.d. 0.6), $P=0.04$). Insulin sensitivity, as estimated by the EH clamp (Table 5), was not modified significantly.

Discussion

The present study shows that a nutritional intervention consisting of simple dietary recommendations focusing on the dietary $n-6/n-3$ PUFA ratio has a favourable metabolic impact including a decrease in LDL-cholesterol, and increases in lipid oxidation and plasma adiponectin. Furthermore, plasma TNF- α (Figure 1) was significantly decreased in agreement with previously reported reductions in *ex vivo* TNF- α production in mononuclear cells after supplementa-

tion with encapsulated fish oil (Endres *et al.*, 1989; Meydani *et al.*, 1991; Caughey *et al.*, 1996; Wigmore *et al.*, 1997).

In contrast to other adipocyte-derived molecules such as TNF- α , adiponectin has been proposed to have protective metabolic and anti-inflammatory properties that could be associated with lower risk of cardiovascular disease (Skilton and Celermajor, 2006). The observed increase in adiponectin levels is consistent with both cross-sectional reports of an inverse correlation between adiponectin and inflammatory mediators in obese subjects (Engeli *et al.*, 2003), and inverse associations with TNF- α levels in human adipose tissue (Kern *et al.*, 2003). Furthermore, the increase in adiponectin is consistent with investigations in mice showing that the consumption of a diet rich in EPA and DHA leads to elevated systemic adiponectin concentration (Flachs *et al.*, 2006; Neschen *et al.*, 2006).

Another important finding of the present work was the impact of the diet on substrate utilization in both fasting and hyperinsulinaemic conditions (Tables 4 and 5). The diet increased lipid oxidation in the fasting state, as already reported with higher supplementation (6 g/day of fish oil for 6 weeks) in healthy humans (Couet *et al.*, 1997). Such effects of $n-3$ PUFA on lipid oxidation can modify total fat mass (Couet *et al.*, 1997), and prevent or partially reverse the fat mass accumulation associated with high-sucrose, high-fructose or high-fat diets in animals (Halvorsen *et al.*, 2001; Lombardo and Chicco, 2006). However, we found no change in body composition, but the magnitude of changes in body fat previously reported (<1 kg of fat mass in 6–8 weeks) was within the variability of the method used in the present study. Moreover, the subjects in this study had normal fat mass at baseline (Table 1).

Epidemiological and interventional studies indicate that the quality of dietary fat influences insulin sensitivity in humans (Rivelles and Lilli, 2003). In particular, saturated fatty acids worsen insulin sensitivity, while MUFA and $n-6$ PUFA cause improvements. The impact of $n-3$ PUFA is less clear. In the present study, using the gold standard for the determination of insulin sensitivity, we saw no significant effect on insulin sensitivity in healthy, young, non-obese adults (Table 5), despite a modest increase in adiponectin.

Table 4 Metabolic values and substrate utilization in the fasting state

	Baseline	10 weeks	P-value
Total cholesterol (mmol/l)	4.3 (0.5)	4.1 (0.5)	0.06
LDL (mmol/l)	2.5 (0.7)	2.3 (0.5)	0.03
HDL (mmol/l)	1.41 (0.24)	1.4 (0.26)	0.93
Triacylglycerol (μ mol/l)	529 (147)	559 (156)	0.47
NEFA (μ mol/l)	472 (204)	453 (166)	0.79
Glycerol (μ mol/l)	73.2 (34.5)	59.5 (23.3)	0.13
Insulin (pmol/l)	42.3 (14.4)	37.4 (10.5)	0.29
Glucose (mmol/l)	4.8 (0.6)	5.0 (0.5)	0.15
Glucose oxidation (mg/kg.min)	1.6 (0.4)	1.3 (0.4)	0.02
Lipid oxidation (mg/kg.min)	0.7 (0.3)	0.9 (0.3)	0.01

Abbreviations: NEFA: non-esterified fatty acids; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.
Data presented as mean (s.d.).

Table 5 Metabolic values and substrate utilisation during euglycemic hyperinsulinemic clamp

	Baseline	10 weeks	P-value
Triacylglycerol (μ mol/l)	398 (133)	431 (198)	0.69
NEFA (μ mol/l)	30.69 (7.47)	27.06 (10.47)	0.23
Glycerol (μ mol/l)	23.00 (8.54)	18.25 (5.18)	0.10
Glucose (mmol/l)	4.93 (0.49)	5.26 (0.41)	0.11
Insulin (pmol/l)	504 (107)	510 (85)	0.80
Glucose oxidation (mg/kg.min)	3.6 (0.70)	3.3 (0.6)	0.04
Lipid oxidation (mg/kg.min)	0.16 (0.26)	0.2 (0.2)	0.44
Insulin sensitivity (mg/kg.min)	9.54 (3.34)	9.96 (2.27)	0.07

Abbreviation: NEFA: non-esterified fatty acids.
Data presented as mean (s.d.).

In contrast, most studies that have reported a relationship between insulin sensitivity and adiponectin concentration have included insulin-resistant subjects (Weyer *et al.*, 2001; Rivellesse and Lilli, 2003).

Many previous studies have used encapsulated fish oil supplements (Simopoulos, 1999; Connor, 2000; Nettleton and Katz, 2005; Hooper *et al.*, 2006), which are unlikely to be suitable for long-term use. In the present experiment, we were able to demonstrate that a simple dietary intervention markedly reduced the $n-6/n-3$ PUFA ratio, assessed by both diet diary and erythrocyte membrane fatty acid concentration (Tables 2 and 3). This is consistent with the data from the Omega Diet (Simopoulos and Robinson, 1999) and the Swedish study (Friberg and Johansson, 2007).

Increased MUFA intake, reduced saturated fat intake or changes in other components of fish and/or oil could also have contributed to the observed results, either by themselves or through interaction with $n-3$ PUFA (He and Daviglus, 2005; Hooper *et al.*, 2006). Such dietary modifications are part of the Mediterranean diet, which has been shown to be highly effective in the secondary prevention of coronary heart disease (de Lorgeril *et al.*, 1999). From a public health perspective, it is interesting to demonstrate that this simple advice on PUFA intake is able to bring about a more globally favourable dietary modification.

Mechanisms that may underlie our observations include $n-3$ PUFA modifying key genes involved in fatty acid oxidation, including acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, carnitine palmitoyltransferase 2 and peroxisomal fatty acid oxidase (Jump and Clarke, 1999; Baker and Gibbons, 2000), and modulating adiponectin expression through AMP-activated kinase activation (Flachs *et al.*, 2006), or interaction with PPAR- γ (Neschen *et al.*, 2006). These increases in adiponectin may subsequently upregulate genes involved in fatty acid oxidation (Yamauchi *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2005).

The present study has some limitations. No control group was included and the sample size was small. Thus, while our findings provide preliminary evidence for an effect of the $n-6/n-3$ PUFA ratio on plasma adiponectin and lipid oxidation, these results require confirmation in larger, controlled trials.

Our results support an impact of $n-6/n-3$ PUFA ratio change at various levels, including favourable anti-inflammatory and lipid profiles. The observed modulation of adiponectin and cytokine levels by a simple nutritional approach independent of changes in body weight, if confirmed among obese and insulin-resistant subjects, would represent an attractive approach in terms of the prevention of diabetes and cardiovascular disease.

Acknowledgements

We thank Monique Sothier, Christine Maitrepierre, Jocelyne Peyrat and Corine Louche-Pellissier for their contribution to

this work. We thank Beckman-Coulter France for the generous gift of antibodies for Hs-CRP measurement as well as P Chaumon and Centre d'éducation, recherche et information en nutrition (CERIN) for financial support and advice. This work was supported by a grant from Association de langue française pour l'étude du diabète et autres maladies métaboliques (ALFEDIAM-Servier) and Fondation pour la Recherche Médicale, France.

The editorial assistance of Ovid M Da Silva, Research Support Office, Research Centre, CHUM is also acknowledged.

References

- Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC *et al.* (2002). Blood levels of long-chain $n-3$ fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* **346**, 1113–1118.
- Baker PW, Gibbons GF (2000). Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin. *J Lipid Res* **41**, 719–726.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.
- Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ (1996). The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in $n-3$ fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* **63**, 116–122.
- Clarke SD (2001). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* **131**, 1129–1132.
- Connor WE (2000). Importance of $n-3$ fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* **71**, 171S–175S.
- Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F (1997). Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**, 637–643.
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Marmelle N (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **99**, 779–785.
- Deharveng G, Charrondiere UR, Slimani N, Southgate DA, Riboli E (1999). Comparison of nutrients in the food composition tables available in the nine European countries participating in EPIC. European prospective investigation into cancer and nutrition. *Eur J Clin Nutr* **53**, 60–79.
- Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D (2004). $n-3$ long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev* **44**, 289–299.
- Ducruzeau PH, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou JP *et al.* (2001). Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* **50**, 1134–1142.
- Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW *et al.* (1989). The effect of dietary supplementation with $n-3$ polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* **320**, 265–271.
- Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J *et al.* (2003). Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* **52**, 942–947.
- Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M *et al.* (2006). Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* **49**, 394–397.
- Friberg P, Johansson M (2007). Effects of an omega-3-enriched Mediterranean diet (modified diet of Crete) versus a Swedish diet. *World Rev Nutr Diet* **97**, 52–66.

- Gerster H (1998). Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* **68**, 159–173.
- GISSI-Prevenzione-Investigators (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* **354**, 447–455.
- Halvorsen B, Rustan AC, Madsen L, Reseland J, Berge RK, Sletnes P *et al.* (2001). Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. *Ann Nutr Metab* **45**, 30–37.
- He K, Daviglus ML (2005). A few more thoughts about fish and fish oil. *J Am Diet Assoc* **105**, 350–351.
- Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Ness AR, Moore HJ *et al.* (2006). Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ* **332**, 752–760.
- Iso H, Kobayashi M, Ishihara J, Sasaki S, Okada K, Kita Y *et al.* (2006). Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan public health center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation* **113**, 195–202.
- Jump DB, Clarke SD (1999). Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* **19**, 63–90.
- Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* **52**, 1779–1785.
- Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ *et al.* (2000). AHA dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American heart association. *Circulation* **102**, 2284–2299.
- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V *et al.* (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr* **71**, 179S–188S.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* **106**, 2747–2757.
- Laville M, Rigalleau V, Riou JP, Beylot M (1995). Respective role of plasma nonesterified fatty acid oxidation and total lipid oxidation in lipid-induced insulin resistance. *Metabolism* **44**, 639–644.
- Lombardo YB, Chicco AG (2006). Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans: a review. *J Nutr Biochem* **17**, 1–13.
- Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A *et al.* (1991). Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* **121**, 547–555.
- Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S *et al.* (2006). Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes* **55**, 924–928.
- Nettleton JA, Katz R (2005). n-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc* **105**, 428–440.
- Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K *et al.* (2004). Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* **351**, 2599–2610.
- Rabasa-Lhore R, Bastard JP, Jan V, Ducluzeau PH, Andreelli F, Guebre F *et al.* (2003). Modified quantitative insulin sensitivity check index is better correlated to hyperinsulinemic glucose clamp than other fasting-based index of insulin sensitivity in different insulin-resistant states. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 4917–4923.
- Rivellese AA, Lilli S (2003). Quality of dietary fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. *Biomed Pharmacother* **57**, 84–87.
- Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco AG, Rouault C, Slama G *et al.* (2005). Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R486–R494.
- Simopoulos AP (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**, 560S–569S.
- Simopoulos AP, Robinson J (1999). *The Omega Diet. The Lifesaving Nutritional Program Based on the Diet of the Island of Crete*. HarperCollins: New York.
- Skilton MR, Celermajer DS (2006). The effects of obesity-related peptides on the vasculature. *Curr Vasc Pharmacol* **4**, 79–85.
- Summers LK, Fielding BA, Bradshaw HA, Ilic V, Beyens C, Clark ML *et al.* (2002). Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia* **45**, 369–377.
- Ukropec J, Reseland JE, Gasperikova D, Demcakova E, Madsen L, Berge RK *et al.* (2003). The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids* **38**, 1023–1029.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE *et al.* (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1930–1935.
- Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Ross JA (1997). Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia receiving oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression of interleukin-6. *Clin Sci (Lond)* **92**, 215–221.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S *et al.* (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8**, 1288–1295.

7 Omega trois et maladie rénales chroniques

7.1 Les perturbations métaboliques au cours de maladie rénales

7.1.1 Syndrome métabolique

Selon les données de l'enquête Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), la prévalence du syndrome métabolique chez les patients insuffisants rénaux est de 18 % et augmente à 36 % lorsque le débit de filtration glomérulaire est inférieur à 45 ml par minute (88). Comme dans la population générale, la présence d'un syndrome métabolique est associée à une mortalité cardio-vasculaire accrue chez les patients insuffisants rénaux, quelque soit le niveau d'inflammation, l'âge et les complications cardio vasculaires préexistantes.

L'insulinorésistance a été initialement décrite chez les patients dialysés par De Fronzo en 1978 en utilisant la technique de clamp euglycémique hyperinsulinique (89, 90). Depuis, de nombreuses études ont montré que les patients hémodialysés présentaient un index HOMA élevé : 32 % ont un index HOMA >1,4 selon Shinohara et al. (91). Cette sensibilité à l'insuline ne diffère pas selon l'étiologie de l'insuffisance rénale. Elle est présente dès le stade III d'insuffisance rénale chronique (IRC) et s'aggrave avec le déclin de la fonction rénale, proportionnellement au débit de filtration glomérulaire (92). Le mécanisme cellulaire de cette insulino résistance n'est pas clairement établi : l'insulinosécrétion et la production hépatique de glucose ne sont pas perturbées, cette dernière étant normalement inhibée par l'insuline (89). Alors que la glycémie à jeûn est normale, la glycémie post prandiale augmente suite à une résistance périphérique à l'insuline, dont le mécanisme est un défaut de signalisation de l'insuline au niveau intracellulaire. Différentes étiologies ont été proposées comme l'acidose, la carence en vitamine D, l'accumulation d'acides gras libres et la dyslipidémie. Les mécanismes actuellement évoqués sont, d'une part, la présence d'un défaut de phosphorylation de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux et d'autre part, une altération du métabolisme du glucose par la voie oxydative et non oxydative au niveau cellulaire (93).

La dyslipidémie est présente chez 40 à 50 % des patients insuffisants rénaux chroniques (94). En effet, elle est associée à une augmentation de la lipolyse entraînant ainsi une

élévation d'acides gras libres (AGL) plasmatiques, une accumulation de la production de VLDL (very low-density lipoprotein), et à une diminution des HDL (high-density lipoprotein) suite à une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase et à une production de LDL (low-density lipoprotein) petites denses et particulièrement oxydables. Sur le plan moléculaire, sur des modèles d'insuffisance rénale expérimentale (néphrectomie du 5/6 chez le rat), l'apparition de dyslipidémie est associée à une diminution de l'expression de l'ARNm de PPAR α au niveau hépatique (95).

- L'insuffisance rénale est associée à une dysfonction adipocytaire

De nombreuses études ont montré, une anomalie de concentrations sériques des adipokines telle que la leptine, l'adiponectine et une augmentation de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 et TNF- α au cours de l'insuffisance rénale (96, 97). La graisse viscérale est associée à une élévation de cytokines proinflammatoires comme l'IL-6 (98) et Axelsson et al ont montré qu'une augmentation des concentrations circulantes de sCD163 (marqueur de macrophages matures) est corrélée de façon positive avec la masse grasse, les cytokines pro-inflammatoires et les molécules d'adhésion endothéliale (99).

Rôle du stress oxydant : Il existe une augmentation des marqueurs de stress oxydant et ceci de façon précoce dès le stade 3 de maladie rénale chronique, montrant que l'insuffisance rénale est un état pro-oxydant. Ainsi, il a été montré une augmentation de différents marqueurs de stress oxydant que ce soit des marqueurs de peroxydation lipidique (F2-isoprostane, anticorps anti LDL oxydé) ou protéique (protéine carbonylée, AOPP) sans qu'il y ait de relation entre le débit de filtration glomérulaire et ces marqueurs (100, 101). Le traitement par dialyse semble inefficace pour corriger ce stress oxydant (102), certains auteurs ont même montré une génération musculaire accrue des marqueurs de stress oxydant et une dysfonction mitochondriale au cours de séances d'hémodialyse (103). Cependant la prévalence de stress oxydant dans la maladie rénale chronique n'est pas clairement connue. Par ailleurs, même s'il a été montré une augmentation significative des marqueurs de stress oxydant chez les patients insuffisants rénaux diabétiques et hypercholestérolémique (100), l'interaction stress oxydant et inflammation au cours de la MRC, ainsi que l'étiologie de ce stress oxydant ne sont pas clairement identifiées. Chez des sujets insuffisants rénaux stade 3 et 4, Ramos et al ont montré une augmentation des marqueurs de stress oxydant (F2 isoprostane, MDA) et une diminution des antioxydants (thiols) corrélée à l'adiposité et aux marqueurs de l'inflammation (104). Enfin plus récemment d'Apolito et al ont montré que l'urée elle même diminue la sensibilité à l'insuline et augmente la sécrétion de résistine et retinol binding protein-4 (RBP-4) sur des adipocytes en culture (cellules 3T3) en augmentant

la génération de ROS (reactive oxygen species) et entraînant une modification post traductionnelle des molécules impliquées dans la signalisation de l'insuline comme IRS et AKT et inhibe le transport du glucose. Cet effet est reproduit par la perfusion d'urée chez des souris alors qu'un traitement anti oxydant permet de prévenir l'insulino résistance et l'augmentation des adipokines au cours de cette perfusion d'urée (105).

7.1.2 Inflammation chronique

Au cours de la MRC, il existe un état micro inflammatoire chronique avec augmentation de CRP et de cytokines pro inflammatoires comme IL-6 et TNF- α qui ne peut être expliqué totalement par la baisse de filtration glomérulaire. Ainsi 30 à 50 % des patients insuffisants rénaux présentent une CRP élevée (106). Cette inflammation existe dès le stade d'insuffisance rénale modérée, semblant indiquer que d'autres facteurs intrinsèques au déclin de la fonction rénale sont impliqués. Cette inflammation s'aggrave avec le déclin de la fonction rénale, et persiste même après l'initiation de la dialyse (hémo ou dialyse péritonéale) (102). Il est actuellement admis qu'elle joue un rôle dans la forte prévalence de dénutrition constatée chez ces patients. En effet, les marqueurs d'inflammation sont significativement corrélés avec les marqueurs de dénutrition tels que l'albumine et la perte de poids (107, 108). Elle est également en partie responsable de l'anorexie, de la diminution de la synthèse protéique et de l'augmentation du catabolisme protéique.

Chez les patients hémodialysés, Raj et al ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm musculaire de SOCS-2 et IL-6 après une séance d'hémodialyse (103), associée à une augmentation des cytokines plasmatiques (IL-6, TNF- α) et de MDA (malonedialdéhyde) suggérant ainsi qu'au cours de séance de dialyse le muscle squelettique pourrait être le lieu d'un stress oxydant et d'inflammation accrus. Au cours de MRC stade III et IV, une étude a montré une relation entre la CRP et le QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) (109).

Le rôle de l'inflammation et l'insulinorésistance sur la morbidité cardio vasculaire au cours de la maladie rénale chronique est bien établi. Par ailleurs, ces deux troubles métaboliques sont également associés à un catabolisme protéique accru et une dénutrition.

7.2 Publication

7.2.1 Titre: L'adiponectine au cours de l'insuffisance rénale est plus liée aux perturbations métaboliques qu'à la perte de fonction rénale.

7.2.2 Résumé

Nous avons caractérisé les anomalies métaboliques à un stade précoce de maladies rénales chroniques. En effet, dans la plupart des études, la population étudiée est très hétérogène et inclut des patients ayant un diabète, obésité, un état inflammatoire chronique ou un traitement pouvant interférer avec les paramètres métaboliques.

Pour cela nous avons étudié, 44 patients en insuffisance rénale chronique (clairance de la créatinine 53 ± 25 ml/min/1.73 m², âge moyen de 45 ans) non diabétiques et non obèses en déterminant les perturbations métaboliques associées au déclin de la fonction rénale. La fonction rénale a été évaluée par la méthode de référence (méthode isotopique par clairance à l'inuline) et nous avons mesuré la composition corporelle (mesure de plis cutanés, index de masse corporelle) et les marqueurs biologiques de métabolisme glucidique (insuline, glucose) lipidique (cholestérol, triglycéride), marqueurs d'inflammation (protéine c réactive), fonction adipocytaire en dosant les deux principales adipokines (leptine et adiponectine) ainsi que le rapport albumine/ créatinine urinaire.

Nous avons ainsi montré que les perturbations métaboliques surviennent à un stade précoce de maladie rénale (stade III de MRC) avec une augmentation de l'adiponectine et une corrélation significative négative en régression simple entre la fonction rénale et l'adiponectine et la leptine. Comme pour le reste des sujets avec fonction rénale normale, nous retrouvons la corrélation négative entre l'adiponectine avec l'index de masse corporelle et la masse grasse chez le sujet insuffisant rénal. Nous avons également montré une corrélation positive entre la leptine et adiponectine chez ces patients qui n'est pas retrouvé chez les patients non insuffisants rénaux obèses ou diabétiques. Un rôle possible de la protéinurie comme déterminant de concentration sérique d'adiponectine est également montré.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation précoce d'adiponectine au cours des maladies rénales chroniques n'est pas le seul fait de la baisse de la clairance mais probablement un mécanisme adaptatif aux perturbations métaboliques. De manière intéressante, sur des patients hémodialysés, Zoccali et al rapportent des concentrations élevées d'adiponectine

avec corrélation négative avec la mortalité cardiovasculaire, les sujets ayant les valeurs d'adiponectine les plus élevées étant plus protégés (96). Il semble donc que toute intervention permettant d'augmenter l'adiponectine plasmatique aurait un effet protecteur sur le risque cardiovasculaire des patients avec MRC. Les oméga trois par leur effets bénéfiques cardiovasculaires et sur les éléments du syndrome métabolique sont naturellement une thérapeutique potentielle.

7.2.3 Article

Original Article

Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function

Fitsum Guebre-Egziabher¹, Jacques Bernhard^{1,2}, Tohru Funahashi³, Aoumeur Hadj-Aissa² and Denis Fouque¹

¹Département de Néphrologie, Hôpital E. Herriot and Research Unit JE 2411, University Claude Bernard, Lyon, France, ²Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles Rénales et Métaboliques, Lyon, France and ³Department of Internal Medicine and Molecular Science, Osaka Medical School, Osaka, Japan

Abstract

Background. Adiponectin, a newly discovered collagen-like protein of the collectin family exclusively produced by adipocytes, possesses anti-inflammatory properties. Plasma adiponectin is associated with a decreased cardiovascular risk in non-renal patients, and is reduced in obesity and insulin-resistant states. Although reports show an increase in the adiponectin level in maintenance haemodialysis, peritoneal dialysis and end-stage renal disease, there is no documentation of adiponectin levels and regulation in the early stages of chronic kidney disease (CKD).

Methods. We prospectively measured glomerular filtration rate (GFR) in 48 patients with CKD using inulin clearance. Fasting blood was drawn to determine insulin, leptin, adiponectin and C-reactive protein (CRP) levels. Body fat mass was calculated using skinfold thickness measurements.

Results. The patients' mean GFR was 53.5 ± 24.9 (SD) ml/min/1.73 m². Adiponectin was in the normal range in men (9.8 ± 2.9 mg/l) and women (16.6 ± 5.0 mg/l) with CKD, being significantly higher in women than men ($P < 0.001$). Serum leptin was above normal (10.4 ± 10.7 µg/l), whereas serum insulin and CRP were within their normal ranges (3.5 ± 3.3 µU/ml and 2.6 ± 5.0 mg/l, respectively). In linear regression analysis, adiponectin was negatively correlated with GFR ($P = 0.02$), fat mass ($P = 0.03$) and body mass index ($P = 0.002$), and strongly positively correlated with serum leptin ($P = 0.003$). A positive relationship was also found between plasma adiponectin and the urinary albumin/creatinine ratio ($P = 0.007$). No relationship was found between adiponectin and insulin or adiponectin and CRP. In multiple regression analysis, adiponectin was significantly positively correlated

with leptin ($P < 0.0001$), negatively with body mass index ($P < 0.0001$) and only weakly with GFR ($P = 0.04$).

Conclusions. Despite an adverse metabolic environment in chronic renal insufficiency, serum adiponectin increases in non-obese patients when renal function deteriorates. Adiponectin is only weakly affected by renal function *per se*, but appears influenced by proteinuria, and more significantly by body mass index and the change in serum leptin that accompanies decline in renal function.

Keywords: hormones; inflammation; insulin; kidney; patients

Introduction

Evidence is accumulating that adipose tissue releases a number of active metabolic compounds, including pro-inflammatory cytokines [1]. These compounds include leptin, adiponectin, resistin, angiotensinogen, tumour necrosis factor- α (TNF- α), plasminogen activator inhibitor type-1 and interleukin (IL)-6. Therefore, obese patients or patients whose clearance of cytokines is impaired, as in chronic renal failure (CRF), may be prone to insulin resistance and accelerated atherosclerosis [2, 3].

Adiponectin, the product of the transcript-1 (apM1) gene, which is exclusively and most abundantly expressed in adipose tissue, is a 244 amino-acid protein structurally homologous to collagen VIII, collagen X and complement fraction C1q [4]. Adiponectin is reported to be abundant in human blood, with its plasma levels in the mg/ml range and, thus, accounting for ~0.01% of total plasma protein. Plasma adiponectin is decreased in obesity, suggesting that the dysregulation of adiponectin may be relevant to obesity-linked disorders [5]; it is also reduced in type 2 diabetes,

Correspondence and offprint requests to: Denis Fouque, MD, Department of Nephrology, Hôpital E. Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France. Email: denis.fouque@chu-lyon.fr

coronary artery disease (CAD) and dyslipidaemia [6]. Several *in vitro* studies indicate that adiponectin plays an important role in the inhibition of the inflammatory response and possesses anti-atherogenic properties [7].

Abnormal glucose, insulin and lipoprotein metabolism are common in patients with CRF. Also well known are increased cardiovascular morbidity and inflammation in these patients [8]. Plasma adiponectin has been reported to be increased in end-stage renal disease (ESRD) before dialysis and in patients on maintenance dialysis (haemodialysis and peritoneal dialysis) [9–11], and to be inversely related to incident cardiovascular events [9]. Whether or not this increase reflects impaired adiponectin clearance by the kidney or whether it is a compensatory mechanism aimed at counteracting increased cardiovascular risk factors is not elucidated yet. In a more recent paper, Zoccali *et al.* [12] report that adiponectin is increased in patients with nephrotic syndrome and that proteinuria is strongly related to circulating adiponectin.

The purpose of this study was to prospectively assess the relation of plasma adiponectin to proteinuria (as measured by urinary albumin/creatinine ratio), body composition, insulin metabolism and biological markers of inflammation in patients with a large range of renal insufficiencies.

Subjects and methods

Patients

We studied 48 patients with known kidney diseases, using as controls 20 volunteers matched for age and weight, with no known kidney disease and negative urinary dipstick analyses. The protocol was approved by the local ethics committee (CCPPRB Lyon A) and informed consent was obtained from each participant.

Kidney function measurement

We used inulin clearance to determine glomerular filtration rates (GFRs). Briefly, inulin [polyfructosan (inutest); Laevosan, Linz, Austria] was infused continuously for 3 h after a priming dose and urine was collected every 30 min by spontaneous voiding. Inulin was measured by a standard colorimetric assay on a Technicon AutoAnalyzer (model AAI Technicon Corporation, Tarryton, NY, USA).

Blood measurements

To determine adiponectin, leptin, insulin and C-reactive protein (CRP), blood was drawn from all subjects at 07.45, before breakfast after an overnight fast. Samples were chilled immediately on ice and centrifuged at 3000 g, then serum or plasma was separated and samples were kept at -70°C until laboratory analysis.

Plasma adiponectin was measured in the laboratory of the Department of Internal Medicine and Molecular Science of the Medical School of Osaka (Osaka, Japan) using a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay [5]

and recombinant adiponectin as standard. Serum leptin was measured in duplicate by radioimmunoassay (Mediagnost GmbH, Tübingen, Germany) using standards and a ^{125}I -tracer prepared from recombinant leptin and a high-affinity polyclonal antibody that recognized specifically and quantitatively human leptin. Plasma insulin was measured by radioimmunoassay using a mouse monoclonal antibody (ERIA Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France). Ultra-sensitive serum CRP was measured by an automated immunonephelometric method, whose detection limit was 0.2 mg/l. The albumin/creatinine ratio was calculated using measurements made on the first urine sample collected after an overnight fast.

Anthropometry

Anthropometric data were obtained once for each subject, at enrolment into the study. They included measured body weight and body fat mass calculated from the Durnin and Womersley tables [13], and were based on skinfold thickness measurements performed in triplicate at four different sites (bicipital, tricipital, subscapular and suprailiac).

Statistics

Data analysis was performed using a statistical software program (Statview, Abacus Concepts®, Berkeley, CA, USA). Quantitative results are reported as means $\pm$ SEM unless indicated otherwise. Correlation between two variables was searched by simple regression analysis. Multiple linear regression analysis was used to define the variables most predictive of circulating adiponectin concentrations, after selecting the parameters that were found to be associated with adiponectin by simple regression analysis or those known to be of importance in the physiology of adiponectin: body mass index (BMI), leptin, insulin, age and GFR. Adiponectin, leptin and the urinary albumin/creatinine ratio, which did not demonstrate a Gaussian distribution, were logarithmically transformed. A *P*-value of <0.05 was considered significant.

Results

Patients' characteristics

We recruited 48 patients with chronic kidney disease (CKD) (36 males), aged 45 ± 13 years, and 20 volunteers (13 males). The main clinical and anthropometric characteristics of the cohort are summarized in Table 1.

Table 1. Clinical and anthropometric characteristics of patients

Age (years)	45 $\pm$ 13
Gender (male/female)	36/12
Arterial pressure	
Systolic (mmHg)	138.8 $\pm$ 16.6
Diastolic (mmHg)	80.3 $\pm$ 9.3
BMI (kg/m^2)	25.1 $\pm$ 3.0
Body weight (kg)	72.5 $\pm$ 11.6
Fat mass (kg)	21.4 $\pm$ 6.2
Fat-free mass (kg)	51.1 $\pm$ 7.4

Values are expressed as means $\pm$ SD, *n* = 48.

Their renal diseases were glomerulonephritis ($n=13$), interstitial nephritis ($n=6$), nephrosclerosis ($n=5$), polycystic kidney disease ($n=3$), and were of other or unknown aetiologies in 21 patients. Diabetic patients and patients treated with steroids were excluded. Of the patients, 30 were on antihypertensive drugs [20 on single therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI), calcium channel blockers, diuretics or β -blockers; 10 on double or triple therapy with various combinations of these drugs].

Biochemical parameters

The biochemical data are summarized in Table 2. The mean plasma adiponectin among the CKD patients 11.5 ± 4.0 mg/l (range: 4.4–29.3 mg/l) was not significantly different from the average value for healthy subjects (10.3 ± 3.9 mg/l; $P=0.41$). Plasma adiponectin was higher ($P<0.0001$) in female (16.6 ± 5.0 mg/l) than in male CKD patients (9.8 ± 2.9 mg/l). The between-genders difference in plasma adiponectin in the patients was similar to that observed in the healthy controls (13.8 ± 3.8 mg/l in women vs 8.4 ± 2.5 mg/l in men; $P<0.01$). Plasma leptin levels among the CKD patients (10.5 ± 7.4 μ g/l) were significantly higher than in healthy subjects (5.49 ± 4.0 μ g/l; $P=0.04$). Women had higher circulating levels of leptin than men, both in CRF (17.5 ± 9.7 vs 8.2 ± 5.7 μ g/l; $P<0.01$) and in healthy subjects (8.7 ± 3.7 vs 3.7 ± 2.9 μ g/l; $P=0.02$). Plasma insulin and CRP levels were in their normal ranges (3.5 ± 2.4 mU/l and 2.7 ± 2.5 mg/l, respectively). Microalbuminuria (as defined by a urine albumin/creatinine ratio between 2 and 20 mg/mmol) was found in 10 patients, whereas 27 patients presented with albuminuria, i.e. a urine albumin/creatinine ratio >20 mg/mmol.

Glomerular filtration rate

The mean GFR was 53.5 ± 24.9 ml/min/1.73 m² (range: 12–107 ml/min/1.73 m²; Table 2), corresponding to stage III of CKD. GFR was <50 ml/min/1.73 m² in 29 subjects.

Table 2. Biochemical data in CKD patients and control subjects

Gender	CKD patients		Controls	
	Male ($n=36$)	Female ($n=12$)	Male ($n=13$)	Female ($n=7$)
GFR (ml/min/1.73 m ²)	55.9 ± 22.5	51.2 ± 20.9	ND	ND
Adiponectin (mg/l)	9.8 ± 2.9	16.6 ± 5.0^a	8.4 ± 2.5	13.8 ± 3.8^b
Leptin (μ g/l)	8.2 ± 5.7	17.5 ± 9.7^a	3.7 ± 2.9	8.7 ± 3.7^c
Insulin (mU/l)	3.8 ± 2.5	2.5 ± 1.8	–	–
CRP (mg/l)	2.6 ± 5.5	2.5 ± 3.3	–	–

Values are expressed as means $\pm$ SD, $n=48$.

^a $P<0.01$, female vs male (CKD).

^b $P<0.01$ and ^c $P<0.05$, female vs male (controls).

ND: not determined.

Relationships between plasma adiponectin and clinical and biochemical parameters

As seen in Figures 1 and 2, plasma adiponectin was inversely correlated with GFR ($r=-0.33$, $P=0.02$) and BMI ($r=0.43$, $P=0.002$). Serum leptin was strongly and positively related to plasma adiponectin (Figure 3). There was also a positive relationship between plasma adiponectin and the urinary albumin/creatinine ratio (Figure 4). Plasma adiponectin was related neither to systolic or diastolic arterial pressure nor to plasma insulin or CRP (data not shown). Antihypertensive treatment had no effect on plasma adiponectin levels. Specifically, the plasma adiponectin of patients being treated with ACEI was not different from that of those who did not receive ACEI (11.4 vs 11.5 mg/l; $P=NS$).

Multiple regression analyses indicated that, in patients with mild renal disease, only BMI ($P<0.0001$), serum leptin ($P<0.0001$) and, to a lesser extent, GFR ($P=0.04$) were correlated with plasma adiponectin levels after adjustment for age, body fat mass and plasma insulin. BMI and serum leptin explained 66% of the variance of plasma adiponectin in our study.

Discussion

Adiponectin and renal function

Since adiponectin has been shown to be elevated above normal in maintenance haemodialysis (MHD), peritoneal dialysis and ESRD patients, we addressed the question of whether or not this increase could happen earlier, before ESRD. The results we obtained by using a 'gold standard' measurement of renal function, inulin clearance, confirm that higher adiponectin levels are found with worsening renal function (Figure 1) and increasing proteinuria (Figure 4). In addition, we show that this increase in plasma adiponectin is explained mainly by the patients' body composition and the

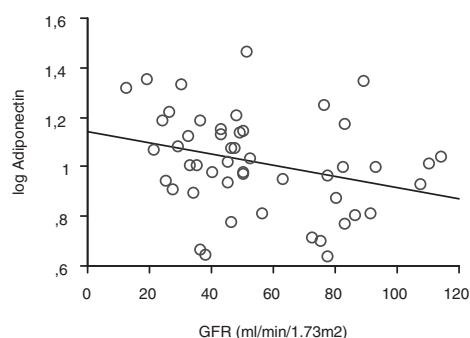


Fig. 1. The inverse relationship between GFR (as measured by inulin clearance) and fasting plasma adiponectin (mg/l, log transformed); $n=48$, $r=0.31$, $P=0.02$.

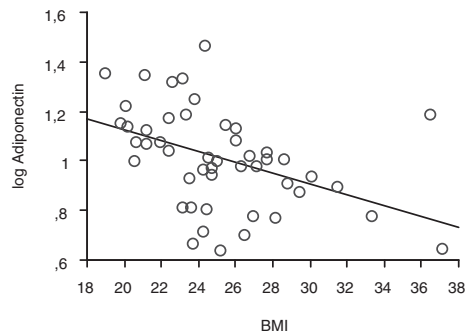


Fig. 2. The inverse relationship between body mass index and fasting plasma adiponectin (mg/l, log transformed); $n=48$, $r=0.43$, $P=0.002$.

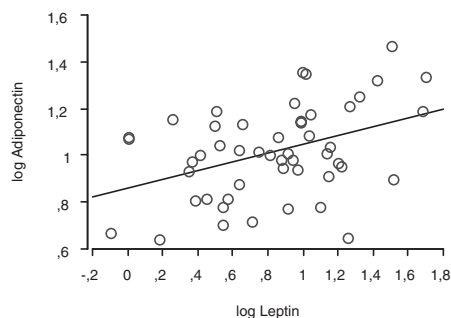


Fig. 3. The positive relationship between serum leptin ($\mu\text{g/l}$, log transformed) and fasting plasma adiponectin (mg/l, log transformed); $n=48$, $r=0.41$, $P=0.003$.

altered metabolic profile (e.g. serum leptin) that occurs with the impairment of renal function. Zoccali *et al.* [12] showed a positive linear relationship between proteinuria and plasma adiponectin in patients with nephrotic syndrome (mean proteinuria: $6.8 \pm 2.6 \text{ g/24 h}$) and in non-nephrotic proteinuric patients (mean proteinuria: $0.98 \pm 1.3 \text{ g/24 h}$). It is interesting to note here that we confirm this finding and also show that it occurs earlier during the course of renal disease, in patients with a less significant proteinuria (Figure 4; mean urinary albumin/creatinine: $80 \pm 13 \text{ mg/mmol}$; range: $0.3\text{--}310 \text{ mg/mmol}$). However, this relationship stops being significant when adjustments are made for other factors (GFR, BMI and serum leptin). Thus, it is possible that, in patients with nephrotic syndrome, massive proteinuria may impact adiponectin more strongly by triggering other yet unidentified metabolic disorders. Another point to clarify is the effect of ACE inhibition on adiponectin levels. Indeed, Furuhashi *et al.* [14] recently showed that ACE inhibition was associated with an increase in plasma adiponectin in patients with essential hypertension. Although we did not show differences in plasma adiponectin between

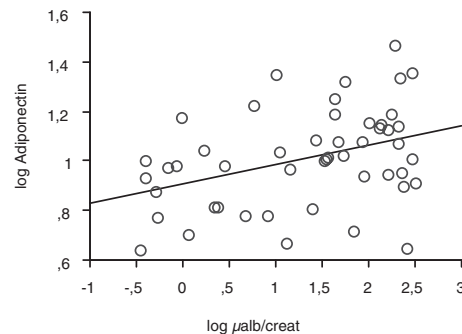


Fig. 4. The positive relationship between urinary albumin excretion (expressed as the urinary albumin/creatinine ratio, mg/mmol, and log transformed) and fasting plasma adiponectin (mg/l, log transformed); $n=48$, $r=0.38$, $P=0.007$.

patients who were taking ACE inhibitors and those who were not, our study was not designed to examine this question. This interesting point requires further research, since ACE inhibitors are the first line of therapy in CKD patients.

Adiponectin and insulin metabolism

Adiponectin is the most abundant gene product in adipose tissue. Plasma adiponectin is decreased in obesity and diabetes [6]. Hotta *et al.* [15] reported simultaneous reductions in insulin action and plasma adiponectin levels with the progression of obesity in rhesus monkeys. The administration of recombinant adiponectin improved hyperglycaemia and hyperinsulinaemia and it was able to reverse insulin resistance in obese mice. In a recent study of 148 women undergoing a glucose-clamp study, adiponectin was positively associated with improved glucose oxidation [16]. Altogether, these findings suggest that adiponectin actively influences glucose and insulin metabolism; however, the link between adiponectin and insulin sensitivity remains unclear. In this study, we were not able to identify a relationship between plasma adiponectin and fasting insulin, perhaps because of one of two reasons. First, a type 2 error due to the limited size of the study, which, however, did not prevent us from observing a rather strong relationship between adiponectin and leptin (the latter would have been strengthened by increasing the number of patients). Second, and more likely, our patients were not obese and had plasma insulin levels within its normal range, which might have limited the insulin-related regulation of adiponectin and allowed leptin to exert the predominant effect on adiponectin. Unfortunately, since we did not collect the necessary data (e.g. fasting blood glucose or HOMA index), we could not get a better insight into the relationship between insulin metabolism and adiponectin in renal failure. Dynamic interventions, such as prolonged fasting or insulin

infusion studies, appear to be warranted to highlight these interactions in patients with CKD.

Adiponectin and body composition

Like many other metabolic hormones, body composition is a strong determinant of plasma adiponectin in other non-renal diseases patients as well as in renal patients. Plasma adiponectin is mainly inversely correlated with body fat mass, BMI or total body weight. Two recent studies have shown increases in plasma adiponectin after substantial weight loss following either gastroplasty or hypocaloric diet [17,18]. By contrast, exercise training had no effect on plasma adiponectin, although it significantly improved insulin sensitivity [19] (but it may not have changed body composition enough to alter plasma adiponectin). Another major determinant of plasma adiponectin is serum leptin [9,16,20,21]. Since serum leptin and plasma adiponectin are strongly linked to fat mass in opposite ways, the relationship between serum leptin and plasma adiponectin still remains unclear. An inverse relationship between leptin and adiponectin has been reported in healthy women, in obese patients [20] and in patients on MHD [9], whereas a positive correlation has been shown in patients with lipodystrophy [21]. In the present study, we found a strong positive relationship between serum leptin and plasma adiponectin (Figure 3), which remains highly significant ($P < 0.0001$) after adjusting for body composition and GFR. It is the most important relationship accounting for the increased plasma adiponectin in CKD patients.

Thus, the rise in plasma adiponectin during progressive renal failure and before ESRD may be the consequence of the well-described increase of serum leptin that occurs when GFR falls [22]. These results disagree with those obtained in MHD patients by Zoccali *et al.* [9], who reported an inverse relationship between serum leptin and plasma adiponectin. These authors also found a negative correlation between adiponectin and insulin, which we did not observe in our patients. It is possible that, in the present study in the absence of hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia might have contributed to the increase of plasma adiponectin. There is presently no clear understanding why adiponectin is low in patients with increased fat mass when adiponectin is produced by adipose tissue. This may result from a negative feedback. Our hypothesis is that such a feedback is impaired in CKD. Alternatively, since serum leptin in obese adults seems to depend on subcutaneous fat while plasma adiponectin depends more on visceral fat [23], it is possible that an abnormal fat repartition in patients with CKD may cause the difference we report here. Indeed, a recent report by Stenvinkel *et al.* [11] in ESRD patients before dialysis (GFR: $6\text{--}7\text{ ml/min/1.73 m}^2$) found a negative correlation between adiponectin and truncal fat mass, although no correlation was found between adiponectin and arm and leg fat mass. A further possible explanation could be that in the present study we did not include obese patients [the mean

BMI of our cohort was 25.1 kg/m^2 (range: $18\text{--}37\text{ kg/m}^2$) and only five patients had a BMI $\geq 30\text{ kg/m}^2$], whereas some of Zoccali's patients had a BMI of 45 kg/m^2 [9]. The fact that obesity induces hyperinsulinaemia and alters plasma adiponectin might partly explain these discrepancies. In addition, we excluded diabetic patients in order to avoid confounding factors with possible impacts on adiponectin levels, a limitation not imposed in other studies of CKD [9–11]. Finally, there is virtually no information on the potential effects of dialysis membranes and biocompatibility on adiponectin metabolism. Thus, dialysis characteristics or differences among patients' body composition and metabolic status may partly explain these observations.

Adiponectin and inflammation

Recent data have demonstrated that in obese patients there is an inverse relationship between, on the one hand, plasma adiponectin and, on the other hand, serum CRP and IL-6 [24], which could underlie a possible mechanism for the well-described increase in cardiovascular risk factors with excessive adiposity. It has been suggested that adiponectin may inhibit the detrimental effects of TNF- α on insulin signalling. Adiponectin may also be a direct marker of CAD, since low plasma adiponectin levels are associated with active CAD [7,11,17]. *In vitro* studies have shown an inhibitory effect of adiponectin on the TNF- α -induced expression of endothelial adhesion molecules [7] and the suppression of the transformation of macrophage to foam cell [25].

Recent data in CKD patients indicate that plasma adiponectin is associated with several risk factors, such as hypercholesterolaemia or hyperinsulinaemia [9,12]. Zoccali *et al.* [9] have reported that plasma adiponectin is an inverse predictor of incident cardiovascular events in MHD patients, despite their adiponectin values being higher than those of controls. It should be noted that cardiovascular risk was still higher in patients with lesser elevations of adiponectin. Thus, in maintenance dialysis, adiponectin seems to remain protective, although this protection may occur in the presence of higher plasma adiponectin levels [9]. We did not find a relationship between plasma adiponectin and CRP here, possibly because of the absence of any true inflammatory process (mean CRP: $2.7 \pm 5.2\text{ mg/l}$; Table 2). This observation is in accordance with the report by Zoccali *et al.* [9]. Two recent studies, however, showed an inverse relationship between adiponectin and CRP among peritoneal dialysis and ESRD patients before dialysis [10,11]. Nevertheless, this point seems important enough to strongly encourage longitudinal prospective studies that examine the relationship between adiponectin and inflammation in CRF patients.

In conclusion, we have shown that plasma adiponectin is elevated when renal function is impaired – as early as CKD stage III (Figure 1) – and particularly in proteinuric patients. This increase is associated mainly with body composition (e.g. BMI) and plasma leptin,

which is known to increase when renal function deteriorates. In our non-obese and non-diabetic patients, no relationship was found between adiponectin and serum insulin or CRP, these latter parameters being in their normal ranges. Thus, the plasma adiponectin rise that occurs when renal function deteriorates may represent an adaptive response to the altered metabolic profile associated with a high cardiovascular risk in CKD patients.

Acknowledgements. We thank Ghislaine Geelen for leptin measurements and Michel Cucherat for statistical counselling. We are particularly indebted to the nurses of the Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle Rénale et Métabolique for their excellent care of the patients.

References

- Halvorsen YD, Wilkison WO, Briggs MR. Human adipocyte proteomics – a complementary way of looking at fat. *Pharmacogenomics* 2000; 1: 179–185
- Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC *et al.* Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin-dependent diabetic patients: relationship with plasma insulin. *Throm Haemost* 1989; 61: 370–373
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409–2415
- Scherer PE, Williams S, Flogiano M *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746–26749
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79–83
- Weyer K, Funahashi T, Tanaka S *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930–1935
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y *et al.* Novel modulator of endothelial adhesion molecules adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473–2476
- Zimmermann J, Herlinger S, Pruy A *et al.* Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55: 648–658
- Zoccali C, Mallamaci F, Triperi G *et al.* Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patient with end stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 134–141
- Huang JW, Yen CJ, Chiang HW *et al.* Adiponectin in peritoneal dialysis patients: a comparison with hemodialysis patients and subjects with normal renal function. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 1047–1055
- Stenvinkel P, Marchlewska A, Pecoits-Filho R *et al.* Adiponectin in renal disease: relationship to phenotype and genetic variation in the gene encoding adiponectin. *Kidney Int* 2004; 65: 274–281
- Zoccali C, Mallamaci F, Panuccio V *et al.* Adiponectin is markedly increased in patients with nephrotic syndrome and is related to metabolic risk factors. *Kidney Int* 2003; 63 [Suppl 84]: S98–S102
- Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974; 32: 77–97
- Furuhashi M, Ura N, Higashiura K *et al.* Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 76–81
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL *et al.* Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50: 1126–1133
- Ryan AS, Berman DM, Nicklas BJ *et al.* Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care* 2003; 26: 2383–2388
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595–1599
- Yang WS, Lee WJ, Funahashi T *et al.* Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3815–3819
- Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ *et al.* Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E861–E865
- Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 173–180
- Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y *et al.* Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2395–2398
- Nordfors L, Lonnqvist F, Heimbürger O *et al.* Low leptin gene expression and hyperleptinemia in chronic renal failure. *Kidney Int* 1998; 54: 1267–1275
- Staiger H, Tschritter O, Machann J *et al.* Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. *Obes Res* 2003; 11: 368–372
- Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K *et al.* Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003; 52: 942–947
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y *et al.* Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001; 103: 1057–1063

Received for publication: 4.12.03

Accepted in revised form: 28.7.04

7.3 Oméga trois et maladies rénales chroniques

7.3.1 Déterminants et apports en oméga 3

La consommation en poisson des patients souffrant de MRC est faible et cela est réflété également par le profil plasmatique et membranaire en AGPI n-3 qui est bas (110). La teneur en AGPI n-3 au niveau des phospholipides membranaires est corrélée avec l'apport en oméga trois (111) chez ces patients. La supplémentation en huile de poisson permet d'augmenter la teneur en AGPI sur les phospholipides des acides gras plasmatiques, et des membranes érythrocytaires (110, 112). Il a été également montré une augmentation de la teneur en AGPI n-3 au niveau des membranes des adipocytes après supplémentation en oméga trois chez ces patients (112).

Pour l'instant, il n'existe pas de recommandations spécifiques à la maladie rénale chronique. Les recommandations américaines en terme de prise en charge du risque cardiovasculaire au cours de maladies rénales chroniques recommandent un apport de poisson au moins deux fois par semaine (113). Pour l'instant, il n'existe aucune étude ayant vérifié l'impact métabolique d'une telle modification de régime chez ces patients.

7.3.2 Effet métabolique

7.3.2.1 Dyslipidémie

L'effet hypolipémiant des oméga trois a été démontré chez les patients insuffisants rénaux dialysés (111) ou non (112). Cet effet est surtout marqué sur les triglycérides et à des doses importantes d'AGPI n-3 au delà de 2 g par jour. Dans une étude randomisée contrôlée Svensson et al ont ainsi montré que l'administration de 2,4 g de DHA et EPA pendant 8 semaines était associée à une diminution de 20 % des triglycérides et une augmentation de 8 % du HDL cholestérol sans modification du cholestérol total et du LDL chez des patients insuffisants rénaux non dialysés.

7.3.2.2 Insulinorésistance

Chez les sujets hémodialysés, il a été montré qu'une supplémentation en EPA+DHA de 2,6 g par jour améliore la sensibilité à l'insuline mesurée par le HOMA-IR, ceci associé à une baisse des marqueurs d'inflammation (114).

Par contre les résultats sont contradictoires concernant l'effet sur le contrôle de pression artérielle. Ainsi, Svensson et al montre l'absence d'effet d'une supplémentation de 8 semaines en AGPI n-3 (2,4 g/j) alors que Mori TA et al avec une supplémentation d'une durée similaire à des doses plus importante d'EPA et DHA (4 g par jour) ont montré une réduction de la pression artérielle en plus de la baisse de LDL cholestérol au cours de maladies rénales chroniques (112, 115).

7.3.2.3 Stress oxydant

Malgré le niveau de stress oxydant élevé chez ces patients, la supplémentation en oméga trois qui sont des acides gras polyinsaturés ne semble pas s'accompagner d'une augmentation du niveau de peroxydation. Ando et al ont même montré une diminution de LDL oxydés après 12 semaines de supplémentation avec 1,8 g/j d'EPA chez des patients dialysés (116). Mais à notre connaissance, il n'y a pas de données sur les marqueurs spécifiques de peroxydation des AGPI.

7.3.2.4 Effet anti inflammatoire

Cappelli et al ont décrit une diminution de la production de TNF- α ex vivo par des cellules mononuclées de patients insuffisants rénaux chroniques ayant reçu une supplémentation de 3,4 g d'EPA+DHA par jour pendant un an (117). Une étude randomisée contrôlée avec l'apport de 2,4 g de AGPI n-3 par jour pendant 8 semaines a montré une diminution non significative de CRP. Il est à noter que les valeurs de CRP au début de cette étude étaient normales (41). Chez des patients hémodialysés, une étude pilote randomisée contrôlée a cependant montré qu'une supplémentation en huile de poisson : 1,3 g EPA+DHA de 12 semaines s'accompagnait d'une baisse significative de CRP sans effet significatif sur le profil lipidique. Cependant ces patients avaient des CRP initiales élevées (supérieurs à 10 mg/L). Il est possible que l'effet anti inflammatoire des oméga trois soit plus marqué dans des états inflammatoires comme ce qui a été décrit dans d'autres pathologies inflammatoires ou que ces effets différents soient liés à la différence de doses et type de supplémentation utilisés.

7.3.3 Effet sur la progression de la maladie rénale

L'intérêt de la supplémentation en huile de poisson dans les maladies rénales chroniques est connu depuis longtemps avec un bénéfice sur la prévention de la progression de la néphropathie à IgA ou maladie de Berger après les premières publications de Donadio (118). Dans cette étude multicentrique, les auteurs rapportaient une diminution de la pente de progression de la fonction rénale avec une supplémentation de doses pharmacologiques d'huile de poisson 12 gélules par jour de Maxepa. De façon intéressante cette même équipe rapporte quelques années plus tard un effet similaire en comparant des fortes doses versus des doses modérées 1,88 g EPA et 1,47 g DHA par jour (119).

7.3.4 Prévention de thrombose d'accès vasculaire de dialyse

Du fait de leur propriété anti aggrégante plaquettaire et anti thrombotique, un certain nombre d'études se sont intéressées sur l'effet positif des oméga trois en terme de prévention de thrombose d'accès vasculaire de dialyse. Avec l'utilisation de doses d'EPA + DHA supérieure à 3 g par jour, il a été montré que les AGPI n-3 auraient un bénéfice dans la prévention de sténose de fistule artério veineuse (120).

Ainsi, la plupart des études ayant examinées le bénéfice d'une supplémentation en oméga trois chez les patients ayant une pathologie rénale chronique ont utilisées des doses pharmacologiques d'oméga trois et sur une population hétérogène en terme d'âge, de pathologies (inclusion de diabétiques, obèses) qui n'a peut être pas les mêmes réponses métaboliques face à ce type de supplémentation. Nous nous sommes posés la question de l'impact métabolique et sur l'expression génique de différentes doses d'AGPI n-3 chez des patients insuffisants rénaux de moins de 65 ans, non diabétiques, non obèses, non dialysés. Par ailleurs, devant la prévalence importante de perturbations métaboliques et pathologies cardiovasculaire d'une part et la reconnaissance du rôle de plus en plus important du tissu adipeux dans leur genèse d'autre part, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet sur l'expression d'un certain nombre de gènes associées à l'inflammation ou l'insulinorésistance.

7.4 Publication

7.4.1 Titre : Effet-dose d'une supplémentation en huile de poisson sur l'inflammation et l'expression génique adipocytaire chez des patients insuffisants rénaux chroniques non dialysés.

Differential dose effect of fish oil supplementation on inflammation and adipose tissue gene expression in chronic kidney disease patients before dialysis. **Guebre-Egziabher**, Debard C, Draï J, Denis L, Pesenti S, Jacques Bienvenu, Laville M, Vidal H, Fouque D.

7.4.2 Résumé

Nous avons émis l'hypothèse qu'une supplémentation en acides gras oméga trois sous la forme d'huile de poisson pendant 10 semaines chez des patients présentant une insuffisance rénale sévère pourrait avoir un effet bénéfique sur le métabolisme et l'inflammation de ces patients. En effet du fait des contraintes diététiques liées à leur maladie rénale (restriction en sel et protéine), il nous semblait difficile d'apporter une contrainte diététique supplémentaire chez ces patients. D'un autre coté, les doses d'oméga trois utilisés dans la prévention de progression de la néphropathie à IgA étant supérieur à 3 g/j, nous avons voulu vérifier l'impact métabolique de ce type de supplémentation.

Nous avons étudié 12 patients ayant comme critères d'inclusion un âge < 65 ans, une clairance < 20 ml/min et IMC entre 20 et 27 kg/m² et critères d'exclusion : présence de diabète, obésité, traitement pouvant interférer avec le métabolisme (corticoïde, AINS,) et anti agrégant plaquettaire. Ces sujets ont été randomisés en deux groupes : groupe A (n=6) prise de 1.8 grammes d'EPA+DHA par jour sous la forme de 6 gélules de MAXEPA par jour et le groupe B (n=6) : prise de 3.6 grammes d'EPA et DHA par jour sous la forme de 12 gélules de MAXEPA par jour. Les sujets avaient la recommandation de ne pas modifier leur habitude alimentaire et leur activité physique. La compliance est mesurée par le comptage des gélules de MAXEPA rendues à la fin de l'étude, une enquête diététique de trois jours et la mesure du profil des phospholipides plasmatiques. Au début et après 10 semaines de traitement, les patients ont bénéficié d'explorations métaboliques incluant : des mesures de paramètres anthropométriques (poids, tour de taille et de hanche, index de masse corporel, et pourcentage de masse grasse par bioimpédance), la mesure de dépense énergétique par calorimétrie indirecte, prise de sang à jeun pour déterminer la glycémie, insulïnémie, le profil lipidique (cholestérol, HDL, LDL), les adipokines (leptine, adiponectine), les marqueurs de

l'inflammation (CRP, TNF et IL-6), et une biopsie de tissu adipeux pour la mesure de l'expression génique par RT-PCR de gènes de l'inflammation (marqueur d'activation macrophagique CD68, marqueur de surface macrophagique CD 14, monocyte chemotactic protein MCP-1), du remodelage de la matrice cellulaire (MMP9) et des adipokines (leptine, adiponectine et les récepteurs R1 et R2 de l'adiponectine). Dans cette étude, nous montrons qu'il existe un effet dose lié au traitement par huile de poisson. Pour les doses modérées d'oméga 3, il existe une tendance à la baisse de l'interleukine 6 plasmatique et une diminution significative de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation du tissu adipeux (CD 68) et le remodelage de la matrice cellulaire (metallo protéase MMP9) sans modification de composition corporelle, de la dépense énergétique, de la sensibilité à l'insuline ni des adipokines. Ceci alors qu'il existe même une augmentation de LDL plasmatique. Pour les patients bénéficiant d'une supplémentation par les doses fortes d'oméga 3, nous montrons une amélioration de leur profil lipidique avec baisse du triglycéride, et augmentation du HDL cholestérol, et une augmentation de l'expression génique de toutes les adipokines (leptine et adiponectine et du récepteur R2 de l'adiponectine) sans modification de leur concentration plasmatique.

- Il s'agit d'une première étude montrant un effet dose réponse des oméga 3 chez les patients insuffisants rénaux. Les résultats de cette étude permettent également de comprendre les résultats contradictoires qui ont été publiés concernant leur effet sur l'inflammation et le métabolisme. Comme ce qui a été montré chez des sujets témoins dans des études ex vivo, l'effet anti inflammatoire des oméga 3 se voit plutôt aux doses modérées, alors que l'effet sur le métabolisme lipidique se voit pour des doses plus fortes et est complètement distincte de l'effet sur l'inflammation. Nous en concluons que les doses administrées de ces acides gras doivent être modulées selon la cible thérapeutique et qu'il n'y a pas d'effet additif par augmentation de doses. Il est possible que différentes voies de signalisation cellulaire sont activées ou inhibées en fonction des doses.

7.4.3 Article



Differential dose effect of fish oil supplementation on inflammation and adipose tissue gene expression in chronic kidney disease patients before dialysis.

Journal:	<i>Clinical Journal of American Society of Nephrology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Articles
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	guebre-egziabher, fitsum; hospices civils de lyon, nephrology; Inserm U 870, regulation metabolique nutrition diabete; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud debard, cyrille; Inserm U 870, regulation metabolique nutrition diabete; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud Drai, Jocelyne; CHLS, Biochemistry; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud denis, laure; CHLS, Biochemistry; Inserm U851; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud pesenti, sandra; Inserm U 870, regulation metabolique nutrition diabete bienvenu, jacques; CHLS, Biochemistry; Inserm U851; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud vidal, hubert; Inserm U 870, regulation metabolique nutrition diabete; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud laville, martine; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud; Inserm U 870, regulation metabolique nutrition diabete; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud Fouque, Denis; Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France, Department of Nephrology; Inserm U 870, regulation metabolique nutrition diabete; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud; Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud
Keywords:	chronic kidney disease, Chronic inflammation, omega-3 fatty acids, metabolism

ScholarOne support: (434)817 2040 ext.167

Differential dose effect of fish oil supplementation on inflammation and adipose tissue gene expression in chronic kidney disease patients before dialysis.

Running title: dose effect of n-3PUFA in CKD

Subject of manuscript: cardiovascular disease in the context of renal dysfunction

Guebre-Egziabher F MD^{1,2,3,4}, Debard C^{2,4}, Draï J^{1,2,4,5}, Denis L PHD^{4,5,6}, Pesenti S^{2,4},

Bienvenu J^{4,5,6} PhD, Vidal H PhD^{2,4}, Laville M MD PhD^{1,2,4} and Fouque D MD PhD^{1,2,3,4}.

(1) Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre hospitalier universitaire

Lyon-Sud, France

(2) Inserm U 870, F-69600 Oullins, France

(3) Hospices civils de Lyon, Département de Néphrologie, Hôpital Edouard Herriot Lyon,

France

(4) Université Lyon-1, Faculté de médecine Lyon Sud, F-69600, France

(5) Hospices civils de Lyon, centre de Biologie, Centre hospitalier universitaire Lyon-Sud,

Lyon

(6) Inserm U851, Lyon, Gerland

Word count :

Abstract : 247

Text : 2990

Correspondance to Dr Guebre-Egziabher Fitsum

Post doctoral fellow, Yale school of medecine, department of internal medecine section of endocrinology

The Anlyan Center, room S260 P O Box 208020 New Haven, Connecticut 06536

FAX: 203 785 3823

E-mail: fitsum.guebre-egziabher@yale.edu

Abstract (247 words)

Background and objectives: n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) show beneficial effects in cardiovascular diseases, partly attributed to their anti-inflammatory properties. Potential effect of n-3 PUFAs on the adipose tissue of patients with chronic kidney disease (CKD) has never been explored and dose related effects are scarce.

Design, setting, participants, measurements: Twelve non dialyzed stage IV - V CKD patients were randomly allocated to receive 1.8 g or 3.6 g of n-3 PUFA (fish oil: FO) per day for 10 weeks. Anthropometric and metabolic parameters, adipose tissue function and gene expression were evaluated at baseline and at 10 week.

Results: Body weight, fat mass, energy intake, fasting glucose and insulin were unchanged. Serum HDL cholesterol was increased and TGL level decreased with the high dose of FO, whereas LDL cholesterol increased with the moderate dose of FO. Serum adiponectin, leptin, CRP, and TNF α were not modified in both groups. IL-6 levels tended to decrease with the moderate dose. In addition, a subset of inflammation related genes (CD68 and MMP9) were reduced in subcutaneous adipose tissue in the moderate dose group. Adiponectin, leptin and adiponR2 gene expression were upregulated with the high dose of FO.

Conclusion: Moderate dose of FO alters the gene expression profile of adipose tissue to a more anti inflammatory status. Increasing the dose to 3.6 g does not bring additional beneficial effect but leads to the upregulation of adipokines gene expression. This suggests a different dose response to n-3 PUFA administration in CKD patients.

Keywords: n-3 PUFA, AT, inflammation, chronic kidney disease, adipokines

Introduction

CKD is associated with high cardiovascular mortality rate ¹. A growing body of evidence suggests that an increased inflammatory state and metabolic disorders are important contributors to the increased cardiovascular disease ².

In the last decades, AT has been recognized to contribute to the production of inflammatory factors ³ and inflammatory alterations in AT appear to underly complications of metabolic diseases such as obesity and diabetes mellitus and recent data indicate that this may also be the case in CKD ^{4,5}. Recent animal and human studies show that blood derived macrophages infiltrate the AT in obesity and therefore contribute to the inflammatory state ⁶⁻⁸. In CKD, Cordeiro et al have recently shown that abdominal fat deposition is associated with increased inflammation, in patients undergoing maintenance haemodialysis ⁹. Furthermore, an increased production of proinflammatory cytokines in AT of patients with end stage renal disease has been reported ⁵.

Diets enriched with n-3 PUFA have been associated with a lower incidence of coronary heart disease (CHD), a reduction of atherosclerotic lesions, and inflammatory markers in non renal patients ¹⁰⁻¹². In rodents, beneficial effect of n-3 PUFA on insulin sensitivity and AT metabolism and gene expression has been reported. N-3 PUFA prevent high fat diet induced matrix remodeling and adipocyte enlargement in AT of obese diabetic mice ¹³. Furthermore n-3 PUFA prevent AT inflammation induced by high fat diet in these mice ¹⁴.

In human, 2 months treatment with 1.8 g n-3 PUFA reduces adiposity, some atherogenic markers and AT inflammation-related genes (matrix metalloprotease MMP9, and macrophage surface markers CD 68, CD11b) in women with type 2 diabetes ¹⁵. In elderly people, high omega-3 consumption increases insulin sensitivity, and reduces inflammatory markers ¹⁶.

1
2
3 In hemodialysis patients, Himmelfarb et al. have reported a significant decrease in IL-6
4
5 without significant change in CRP and oxydative stress markers with a supplementation of
6
7 800 mg of DHA and gamma Tocopherol ¹⁷.

8
9
10 Given these observations, we hypothesized that:

11
12 -Moderate n-3 PUFA supplementation may improve plasma inflammatory markers and
13
14 inflammatory gene expression in AT of CKD patients.

15
16 -We also assessed if increasing the dose of fish oil has a greater beneficial effect on
17
18 inflammation.

19
20 Materials and methods:

21
22 Subjects:

23
24 Twelve CKD patients were recruited from the department of nephrology hôpital Edouard
25
26 Herriot, Lyon, France. Main inclusion criteria were: age 18-65 years, GFR $\leq$ 20 ml/min, BMI
27
28 $\leq$ 27 kg/m². Exclusion criteria were: presence of diabetes, inflammatory disease, fish oil or n-
29
30 3PUFA supplementation in the previous 3 months, ongoing active illness requiring
31
32 hospitalization, Warfarin, steroid or anti aggregant agent use and pregnancy. All subjects gave
33
34 their written consent after being informed of the nature and purpose of the study. The
35
36 experimental protocol was approved by the ethics committee of hospices civils de Lyon and
37
38 performed according to french legislation (Loi Huriet).

39
40 The subjects were randomized to moderate fish oil supplementation (group A n=6, 6 capsules
41
42 of MAXEPA laboratoire Pierre Fabre Médicament, Boulogne, France) or high fish oil
43
44 supplementation (group B, n=6, 12 capsules of MAXEPA) for 10 weeks. Each capsule was
45
46 certified to contain a minimum of 180 mg of EPA (eicosapentaenoic acid) and 120 mg of
47
48 DHA (docosahexaenoic acid).

Participating subjects were requested to follow their usual diet recommendation and fish consumption, and keep their initial calory intake and nutrients proportions as well as their physical activity constant throughout the study.

All subjects were given written and verbal instructions by a dietetician on how to complete a 3-day (2 weekdays and one weekend day) dietary record before the initiation and during the last week of the fish oil supplementation. PUFA intakes were calculated using food composition tables specific to our country (CIQUAL table)¹⁸.

Each participant was referred to the Centre de Recherche of Nutrition Humaine (CRNH) Rhône Alpes, for a comprehensive series of tests following an overnight fast at baseline and at the end of the intervention. After anthropometric and body composition measurements, blood was drawn for determination of fasting lipid, glucose, insulin and several systemic adipokines (adiponectin, leptin, IL-6, TNF- α), CRP, and plasma phospholipids fatty acid composition. Resting metabolic rate was measured by indirect calorimetry and AT biopsies were performed.

Weight and body composition

Body weight was recorded with the subject wearing no shoes and light clothing to the nearest 0.1 Kg with an electrical scale. The waist to hip (W/H) ratio was calculated. Body composition was determined with a single frequency bioelectrical impedance device (Star 50, Spengler, Cachan France).

Continuous indirect calorimetry was performed with a ventilated hood system (Deltatrac, Datex Instruments Corp., Helsinki, Finland) during 60 minutes¹⁹.

Laboratory analysis

Plasma glucose, cholesterol, LDL, HDL, triacylglycerol and albumin were measured using standard automated laboratory techniques.

1
2
3 Plasma insulin was quantified in duplicate by radioimmunoassay (Ins Irma, Kip 1251, MDS
4
5 Nordion, France). C reactive protein (CRP) was assessed by immunonephelometry.
6
7
8 Free fatty acids were measured by the colorimetric enzymatic method. Adiponectin was
9
10 measured using an immunoassay technique (Quantikine assay, R & D Systems ®,
11
12 Minneapolis, MN, USA) and leptin with an ELISA technique (BioVendor® assay, Modrice,
13
14 Czech Republic). Cytokine profile was investigated using peripheral venous EDTA blood
15
16 samples. After centrifugation, plasma was stored in aliquot at –80° until analysis. Plasma IL-6
17
18 and TNF α concentration was analysed using a quantitative enzyme linked Immunosorbent
19
20 assay (Beckman Coulter/Immunotech, Marseille, France; Invitrogen/Biosource, Nivelles,
21
22 Belgium, respectively), following manufacturer's instructions. All samples were assayed in
23
24 duplicate.

25 Plasma phospholipid fatty acid composition

26
27
28
29
30
31
32 Lipids were extracted by chloroform methanol (1:1, v/v). The extract was washed by saline
33
34 solution to remove proteins. The chloroform phase was concentrated under a stream of
35
36 nitrogen and taken up in chloroform methanol. The lipid classes were separated by thin layer
37
38 chromatography on silicagel plates (Merck 5721) using petroleum ether-ethyl ether –acetic
39
40 acid as developing solvent. The plates were sprayed with bromophenol blue and individual
41
42 bands of phospholipids and cholesteryl esters were scrapped off into separated tubes. The
43
44 phospholipids fraction was saponified and transmethyalted with sodium methylate, and the
45
46 cholesteryl ester fraction was methylated with sulphuric acid and dehydrated methanol. The
47
48 methyl esters of each fraction were removed by hexane and analysed by gas liquid
49
50 chromatography on a Fison GC-8000 gas chromatograph (Thermo Separation Products-Les
51
52 Ullis – France) equipped with a CP-SIL fused silica capillary column (25 m x 0,25 mm internal
53
54 diameter coated with 100% cyanopropyl siloxane 88 phase 0,2 μ m, Chrompack Les Ullis,
55
56 France, helium as carrier gas, and a split ratio 1: 20.
57
58
59
60

Identification of the individual methyl ester components was made by frequent comparison with authentic standards and with their retention times. The results were expressed as percentage of the total area of all fatty acid peaks in each lipid fraction and quantified (mg/l) with the internal Standard added at the beginning of analysis.

Adipose tissue biopsies

Subcutaneous abdominal white AT samples were obtained from the peri umbilical level by needle biopsy under local anesthesia, as previously described²⁰. Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at – 80 °C for later extraction of RNA.

RNA extraction

Total RNA from subcutaneous tissue was obtained by using the mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers recommendations.

Quantification of mRNA by using real-time RT-PCR

First-strand cDNAs were synthesized from 250 ng of total RNA in the presence of 100 U of Superscript II (Invitrogen, Eragny, France) and a mixture of random hexamers and oligo (dT) primers (Promega, Charbonnières, France). Real-time RT-PCR was performed using ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Courtaboeuf, France) with a Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, Paris, France). For the purpose of quantification, a standard curve was systematically generated with six different amounts (150 to 30,000 molecules/tube) of purified target cDNA cloned in the pGEM plasmid (Promega). Each assay was performed in duplicate and validation of the real-time PCR runs was assessed by evaluation of the melting temperature of the products and by the slope and error obtained with

Identification of the individual methyl ester components was made by frequent comparison with authentic standards and with their retention times. The results were expressed as percentage of the total area of all fatty acid peaks in each lipid fraction and quantified (mg/l) with the internal Standard added at the beginning of analysis.

Adipose tissue biopsies

Subcutaneous abdominal white AT samples were obtained from the peri umbilical level by needle biopsy under local anesthesia, as previously described²⁰. Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at – 80 °C for later extraction of RNA.

RNA extraction

Total RNA from subcutaneous tissue was obtained by using the mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers recommendations.

Quantification of mRNA by using real-time RT-PCR

First-strand cDNAs were synthesized from 250 ng of total RNA in the presence of 100 U of Superscript II (Invitrogen, Eragny, France) and a mixture of random hexamers and oligo (dT) primers (Promega, Charbonnières, France). Real-time RT-PCR was performed using ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Courtaboeuf, France) with a Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, Paris, France). For the purpose of quantification, a standard curve was systematically generated with six different amounts (150 to 30,000 molecules/tube) of purified target cDNA cloned in the pGEM plasmid (Promega). Each assay was performed in duplicate and validation of the real-time PCR runs was assessed by evaluation of the melting temperature of the products and by the slope and error obtained with

the standard curve. TATA box binding protein (TBP) mRNA levels were measured as internal standard.

Statistical methods:

All values are expressed as mean $\pm$ SEM. Paired t-tests and the Wilcoxon rank tests were performed for comparison between final and baseline values or the percent variation from baseline when applicable. Data analysis were undertaken using statview statistical software program (statview version, SAS institute Inc., Cary, NC, USA). Relations between variables were analyzed by the non parametric Spearman's correlation test and r coefficients are provided. P-value less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patient compliance

Fish oil treatment was followed by subjects without any reported side effects. According to self-report, the subject lifestyle was unchanged throughout the study. We evaluated n-3 fatty acid composition of plasma phospholipids. The level of EPA (C20 :5 n-3) and DHA (C22-6 n-3) acids in plasma was significantly increased in both groups, whereas arachidonic acid (C20-4 n-6) concentration decreased. Accordingly the ratio n-6/n-3 significantly decreased in both groups (table 1). Furthermore, the count of returned FO capsules showed a 97% compliance.

Baseline characteristics

At baseline, there were no detectable significant differences in clinical and biological variables measured between the two treatment groups (table 2). In the 12 CKD patients there was a significant positive correlation between percent fat mass and leptin, CD14, MMP9 and

CD68 gene expression in AT. Serum leptin level was also correlated with CD14 and CD 68 gene expression (table 3).

Effects of intervention

Dietary control, anthropometry, nutrients utilisation

There was no significant difference between the groups in the daily intake of total energy and nutrients per weight as estimated by 3-day dietary records (table 2). Body weight, BMI, and percent fat mass measured by bioelectrical impedance remained unchanged in both groups. Resting metabolic rate, glucose and lipid oxidation were not significantly modified by the intervention either (table 2).

Lipid and Glucose homeostasis

Fasting plasma glucose and insulin were not significantly influenced by fish oil treatment. Plasma triacylglycerol was significantly lower after 10 weeks in the group B. Cholesterol HDL was also significantly increased in this group and remained unchanged in group A, while LDL cholesterol increased in the latter. Plasma free fatty acids remained unchanged in both groups (table 4).

Adipokines and inflammatory factors

Interleukin 6 tended to decrease after 10 weeks of moderate fish oil supplementation (group A) without reaching statistical significance ($p=0.07$). It is of notice that baseline plasma IL-6 levels are more elevated in group A compared to group B without reaching significance. Plasma concentrations of leptin, adiponectin, CRP, $\text{TNF } \alpha$, were not significantly changed after the treatment in either group (tables 4 and 5).

Gene expression analysis in AT

Leptin, adiponectin and adiponectin receptor 2 (adipo R2) gene expression was significantly increased in the group B, and remained unchanged in the group A (figure 1). A series of genes

1
2
3 encoding inflammation related factors was also analyzed. Among these genes the matrix
4
5 metalloprotease MMP9, and the macrophage phagocytic activity marker CD68 were
6
7
8 significantly reduced in group A. Interleukin IL-6 gene expression was also reduced without
9
10 reaching significance. No significant changes were observed in the monocyte chemotactic
11
12 protein (MCP-1) in either group (figure 2).
13
14
15

16 17 Discussion

18
19 In this study we assessed changes in systemic metabolic and inflammatory markers as well as
20
21 AT inflammatory and adipokines gene expression in a 10 week intervention trial in non
22
23 dialyzed CKD patients. Supplementation with 1.8 g n-3 PUFA which is a moderate dose of
24
25 FO, resulted in anti inflammatory changes in blood and adipocytes gene expression profiles.
26
27 These effects were seen despite the significant increase of LDL cholesterol.
28

29
30 In addition, supplementation with 3.6 g n-3 PUFA did not show anti inflammatory effect but
31
32 up regulated adipokine genes expression in AT and improved blood lipid profile.
33
34

35
36 The anti inflammatory effect of 1.8 g EPA+DHA is mainly characterized by a trend for a
37
38 decrease in IL-6 and a decreased expression of MMP9 and CD68 in AT. Although increased
39
40 adiposity represents a major risk factor for the development of type 2 diabetes and its'
41
42 associated cardiovascular complications, an emerging paradigm supports the view that AT
43
44 dysregulation, characterized by impaired lipid storage and inflammatory cytokines
45
46 production, might play a crucial role in the pathogenesis of insulin resistance and
47
48 atherosclerosis³. Thus, beneficial effect of fish oil on CVD risks could be mediated by a
49
50 decrease in the inflammatory markers secreted by AT¹⁴. In our study moderate FO treatment
51
52 significantly reduced or tended to reduce the expression of a cluster of inflammation related
53
54 genes in the subcutaneous AT. Some of these markers such as the metalloprotease (MMP9),
55
56 and phagocytic activity (CD68), were positively correlated with adiposity (percent fat mass) at
57
58
59
60

baseline (table 3). The result of our study is supported by other several recent human and experimental studies. In rodents, 6 week of n-3 PUFA supplementation prevents AT inflammation induced by high fat diet¹⁴. Furthermore, Huber et al have shown that fish oil supplementation prevents high fat induced matrix remodeling in AT¹³. Additionally, in post menopausal type 2 diabetic women, Kabir et al. have shown that moderate FO treatment decreases adiposity and the expression of some inflammation- related genes in AT without any effect on insulin sensitivity¹⁵. Hence, our observations on AT gene expression are in line with these previous studies.

The current study was not able to demonstrate a significant alteration in concentrations of systemic inflammatory factors in response to fish oil treatment in patients with CKD. In patients with inflammatory conditions cytokine concentration or production are influenced by EPA and DHA supplementation in a relatively large number of studies²¹. However, some of these studies suggest that local effects at the site of inflammation might be more pronounced than systemic effect^{15,22}. In addition, it has been reported that the effects of PUFA supplementation are mainly detectable when CRP is already elevated at baseline^{23,24}, which was not the case in our population. In inflamed hemodialysis patients, Saifullah et al have shown that supplementation with 1.3 g of EPA+DHA leads to a significant decrease in CRP²⁵.

An interesting finding of our study is that increasing dose of FO does not bring additional beneficial anti inflammatory effect. In fact there is a trend for an increase of the inflammation related gene expression in AT, despite an improved lipid profil.

In an ex vivo study on cytokine production by monocytes Trebble et al have reported a negative but U shaped dose response relationship between long chain n-3 fatty acids intake and IL-6 in an open uncontrolled study, with a maximum inhibition demonstrated at a supplementary intake of 1g/Day²⁶. Wallace et al have found a similar result in a controlled

1
2
3 blinded parallel study²⁷. Current data from supplementation studies in healthy subjects have
4
5 failed to reveal a threshold value for, and dose response effects on immunomodulation with
6
7 EPA and DHA²⁸. Inflammatory cytokine concentrations and production are influenced by
8
9 fish oil in a relatively large number of studies in patients with inflammatory conditions. As
10
11 the designs and experimental conditions used differ between studies it is not possible to
12
13 thoroughly investigate the potential presence of dose-response effects. Data allowing direct
14
15 comparison within the same inflammatory disease are very limited and inconclusive. Our
16
17 data clearly suggests that increasing the intake of FO up to 3.6 g/day has no beneficial
18
19 immunomodulatory effect.
20
21 Another interesting finding of our study is the upregulation of adipokines (leptin and
22
23 adiponectin) and adiponectin associated with the decrease of triacylglycerol and increase of
24
25 HDL. It has been reported that feeding with a diet containing large amounts of fish oil
26
27 increases plasma adiponectin concentration in rats²⁹ and mice³⁰. Neschen et al have shown
28
29 an increased adiponectin gene expression in epididymal fat and that the increase of plasma
30
31 adiponectin was likely mediated by the activation of PPAR (peroxisome proliferator-activated
32
33 receptor) in mice fed fish oil in a dose dependent fashion³⁰. In obese human subjects
34
35 supplementation with 1.8 g of EPA has been reported to decrease triacylglycerol and increase
36
37 plasma adiponectin levels³¹. Moreover, EPA has been found to increase the expression of
38
39 PPAR γ itself³². The favorable impact of FO administration on lipoprotein profile in non
40
41 dialyzed CKD patients has been reported by Svensson et al. with a 8 weeks administration 2.4
42
43 g EPA+DHA³³. In their study, they also show that patients with self-reported high fish intake
44
45 had greater n-3 PUFA content in AT compared with patients with low fish intake, suggesting
46
47 a good incorporation of these PUFA in AT. It is possible that the incorporation of these fatty
48
49 acids in AT might modulate the expression of transcription factors and increase the number of
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

small differentiated adipocytes able to produce more adiponectin. But these authors were not able to show an effect on CRP³⁴.

Our study has however some limitations. First the limited number of patients may have not allowed us to reach significance. Second, the duration of the study was relatively short, eventually limiting the detection of systemic effect. Third, because of the limited amount of fat taken by biopsy, confirmation of gene expression changes at the protein level could not be determined in AT. However, the studied population was homogenous, with similar range of GFR, and with exclusion of diabetic, obese and also elderly subjects, to tentatively reduce the impact of other confounding metabolic factors. The compliance was excellent and confirmed by fatty acid composition in plasma. Furthermore, we observed changes in gene expression whereas body composition was not modified throughout the study in both groups. Finally, this is the first study to report a dose effect response to n-3 PUFA which may contribute to explain conflicting data about their anti inflammatory effects.

In conclusion, this study showed that the daily intake of 1.8 g n-3 PUFA for 10 weeks alters the gene expression profiles of adipose tissue in the direction of a more antiinflammatory like profile, whereas high FO has no immunomodulatory effect while upregulating some adipokines gene expression and improving lipid profile. These data suggest a differential dose response effect of n-3 PUFA. More long term studies are needed to confirm these observations in a larger scale population and their physiopathological consequences in the follow-up of CKD patients.

Aknowledgments

This work was supported by GRIP (genzyme renal innovation program) grant to FGE.

We are grateful to Monique Sothier for dietary counseling of the patients and dietary data analysis.

None of the authors had a conflict of interest.

For Peer Review

References

1. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296-305, 2004
2. Menon V, Wang X, Greene T, Beck GJ, Kusek JW, Marcovina SM, Levey AS, Sarnak MJ: Relationship between C-reactive protein, albumin, and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 42:44-52, 2003
3. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-15, 1995
4. Ramos LF, Shintani A, Ikizler TA, Himmelfarb J: Oxidative stress and inflammation are associated with adiposity in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol* 19:593-9, 2008
5. Roubicek T, Bartlova M, Krajickova J, Haluzikova D, Mraz M, Lacinova Z, Kudla M, Teplan V, Haluzik M: Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. *Nutrition* 25:762-8, 2009
6. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-808, 2003
7. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-30, 2003
8. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM: Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118:2992-3002, 2008
9. Cordeiro AC, Qureshi AR, Stenvinkel P, Heimbürger O, Axelsson J, Barany P, Lindholm B, Carrero JJ: Abdominal fat deposition is associated with increased inflammation, protein-energy wasting and worse outcome in patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2009
10. Breslow JL: n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 83:1477S-1482S, 2006
11. Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, Muller M, Afman LA: Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 90:415-24, 2009
12. Guebre-Egziabher F, Rabasa-Lhoret R, Bonnet F, Bastard JP, Desage M, Skilton MR, Vidal H, Laville M: Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 62:1287-93, 2008
13. Huber J, Löffler M, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Todoric J, Zeyda M, Geyeregger R, Schreiner M, Weichhart T, Leitinger N, Waldhausl W, Stulnig TM: Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes (Lond)* 31:1004-13, 2007
14. Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhausl W, Stulnig TM: Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese

- diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 49:2109-19, 2006
15. Kabir M, Skurnik G, Naour N, Pechtner V, Meugnier E, Rome S, Quignard-Boulange A, Vidal H, Slama G, Clement K, Guerre-Millo M, Rizkalla SW: Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Am J Clin Nutr* 86:1670-9, 2007
 16. Tsitouras PD, Gucciardo F, Salbe AD, Heward C, Harman SM: High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults. *Horm Metab Res* 40:199-205, 2008
 17. Himmelfarb J, Phinney S, Ikizler TA, Kane J, McMonagle E, Miller G: Gamma-tocopherol and docosahexaenoic acid decrease inflammation in dialysis patients. *J Ren Nutr* 17:296-304, 2007
 18. Deharveng G, Charrondiere UR, Slimani N, Southgate DA, Riboli E: Comparison of nutrients in the food composition tables available in the nine European countries participating in EPIC. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Eur J Clin Nutr* 53:60-79, 1999
 19. Laville M, Rigalleau V, Riou JP, Beylot M: Respective role of plasma nonesterified fatty acid oxidation and total lipid oxidation in lipid-induced insulin resistance. *Metabolism* 44:639-44, 1995
 20. Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou JP, Vidal H: Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 50:1134-42, 2001
 21. Sijben JW, Calder PC: Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc* 66:237-59, 2007
 22. Matsuyama W, Mitsuyama H, Watanabe M, Oonakahara K, Higashimoto I, Osame M, Arimura K: Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on inflammatory markers in COPD. *Chest* 128:3817-27, 2005
 23. Ciubotaru I, Lee YS, Wander RC: Dietary fish oil decreases C-reactive protein, interleukin-6, and triacylglycerol to HDL-cholesterol ratio in postmenopausal women on HRT. *J Nutr Biochem* 14:513-21, 2003
 24. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM: Dietary alpha-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 85:385-91, 2007
 25. Saifullah A, Watkins BA, Saha C, Li Y, Moe SM, Friedman AN: Oral fish oil supplementation raises blood omega-3 levels and lowers C-reactive protein in haemodialysis patients--a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 22:3561-7, 2007
 26. Trebble T, Arden NK, Stroud MA, Wootton SA, Burdge GC, Miles EA, Ballinger AB, Thompson RL, Calder PC: Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *Br J Nutr* 90:405-12, 2003
 27. Wallace FA, Miles EA, Calder PC: Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr* 89:679-89, 2003
 28. Mebarek S, Ermak N, Benzaria A, Vicca S, Dubois M, Nemoz G, Laville M, Lacour B, Vericel E, Lagarde M, Prigent AF: Effects of increasing docosahexaenoic acid intake in human healthy volunteers on lymphocyte activation and monocyte apoptosis. *Br J Nutr* 101:852-8, 2009
 29. Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco AG, Rouault C, Slama G, Rizkalla SW: Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-

- 1
2
3 fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R486-R494,
4 2005
- 5 30. Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, Gillum M,
6 Shulman GI: Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-
7 activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes* 55:924-8, 2006
- 8 31. Itoh M, Suganami T, Satoh N, Tanimoto-Koyama K, Yuan X, Tanaka M, Kawano H,
9 Yano T, Aoe S, Takeya M, Shimatsu A, Kuzuya H, Kamei Y, Ogawa Y: Increased
10 adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of
11 obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1918-25, 2007
- 12 32. Chambrier C, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefont-Rousselot D, Therond
13 P, Hainque B, Riou JP, Laville M, Vidal H: Eicosapentaenoic acid induces mRNA
14 expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res* 10:518-25,
15 2002
- 16 33. Svensson M, Christensen JH, Solling J, Schmidt EB: The effect of n-3 fatty acids on
17 plasma lipids and lipoproteins and blood pressure in patients with CRF. *Am J Kidney*
18 *Dis* 44:77-83, 2004
- 19 34. Madsen T, Schmidt EB, Christensen JH: The effect of n-3 fatty acids on C-reactive
20 protein levels in patients with chronic renal failure. *J Ren Nutr* 17:258-63, 2007
- 21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Fatty acid composition of plasma phospholipids at baseline and after 10 weeks of fish oil treatment.

	Group A (n=6)			group B (n=6)		
	Baseline	week 10	% change From Baseline	Baseline	week 10	% change From baseline
Plasma phospholipid Fatty acids (%)						
20:5 n-3 (EPA)	0.72±0.40	4.05±0.73 ¹	605.4±352.1	0.70±0.27	6.95±1.60 ²	1011±432
22 :6 n-3 (DHA)	3.52±0.77	6.52±0.78 ¹	96.1±63.1	2.92±0.52	6.53±1.06 ¹	132.8±69.6
20 :4 n-6	10.38±1.29	8.57±0.63 ¹	-16.82±8.22	10.82±1.59	8.05±0.55 ¹	-24.3±11.9
Ratio n-6/n-3	2.17±0.50	1.54±0.15 ¹	-26.7±11.7	2.64±0.79	0.98±0.20 ¹	-60.7±11.9
n-3 index	4.23±1.05	10.57±0.92 ²	162±70	3.62±0.77	13.48±1.89 ²	287±101

EPA, eicosapentaenoic acid, DHA, docosahexaenoic acid, C20 :4 n-6 arachidonic acid, n-3 index, (20 :5 n-3 + 22 :6 n-3),

Ratio n-6/n-3, (20 :4n-6 + 22 :4n-6+ 22 :5 n-6)/(20 :5n-3 + 22 :5 n-3 + 22 :6 n-3)

¹ p < 0.05

² p<0.01

Table 2 : dietary records data, anthropometric and biochemical measurements at baseline and after 10 weeks of fish oil supplementation.

	Group A (n=6)		Group B (n=6)	
	Baseline	10 week	Baseline	10 week
Energy (kcal/d)	2013±437	1973±441	1581±64	1703±259
Carbohydrate (g/d)	234±66	216±60	164±35	180±72
Protein (g/d)	87±22	82±21	65±7	78±5
Lipids (g/d)	81±15	86±21	74±11	74±17
SFA (g/d)	30±8	35±11	27±6	29±7
MUFA (g/d)	25±5	32±6	27±9	28±6
PUFA (g/d)	14±5	9±3	9±2	8±4
Weight (kg)	69.4±9.3	69.9±7.7	63.9±15.5	64.8±15.6
BMI (kg/m ²)	23.2±1.8	23.4±1.6	23.4±3.8	23.7±3.8
Waist/hip	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.05
% fat mass	25.1±8.3	24.4±8.7	25.8±6.9	25.7±7.1
serum creatinine (μmol/L)	418 ±145	428.7±179.3	337± 102	367.2±122.7
GFR (ml/min)MDRD	13.8±5.0	14.8±7.7	16.0±5.2	15.3±6.4
Serum Bicarbonate (mmol/L)	22.8±3.6	21.1±2.1	24.6±2.6	22.6±0.9
Serum albumin (g/L)	43.3±3.1	42.2±3.1	41.8±3.6	42.3±4.6
Glucose oxidation (mg/kg.min)	1.8±0.6	1.6±0.2	1.3±0.5	1.3±0.8
Lipid Oxidation (mg/kg.min)	0.5±0.2	0.5±0.2	0.7±0.2	0.6±0.3
REE (kcal/d)	1396±175	1350 ±199	1314±279	1296±295

SFA, saturated fatty acids ; MUFA, monounsaturated fatty acids ; PUFA, poly unsaturated fatty acids ; BMI, body mass index ; GFR , glomerular filtration rate ; REE, resting energy expenditure. Data are expressed as mean ±SEM.

Table 3: Correlations between values of adipose tissue gene expression of some adipokines and inflammatory markers in one hand and clinical variables on the other hand

	Plasma concentration		
	Baseline	fat mass percentage	plasma leptin
	value	(%)	(ng/mL)
Baseline value		25.5±7.3	20.1±28.3
mRNA/TBP			
leptin	5025.9±4046.9	0.85 ¹	0.82 ⁶
adiponectin	32799.1±18231		
CD68	2919.9±1761.9	0.71 ³	0.70 ⁷
CD14	463.5±286.2	0.95 ⁴	0.72 ⁸
MCP-1	28.2±12.1		
MMP9	2416.0± 2307.3	0.63 ⁵	0.54 ²

CD68, macrophage phagocytic activity marker, CD14 macrophage surface marker, MCP-1, monocyte chemotactic protein, MMP9, metalloprotease 9, TBP, TATA box binding protein

Values are expressed as mean± SEM

¹p= 0.005

²p= NS

³p=0.03

⁴p=0.01

⁵p=0.04

⁶p=0.007

⁷p=0.04

⁸p=0.04

Table 4 : Lipid and glucose homeostasis and adipokines at baselines and after 10 weeks fish oil treatment.

	Group A (n=6)			group B (n=6)		
	Baseline	week 10	% change From Baseline	Baseline	week 10	% change From baseline
Cholesterol (mmol/L)	5.1±1.4	5.6±1.8	8.1±7.8	4.6±0.7	4.8±0.9	3.8±13.6
HDL (mmol/L)	1.3±0.4	1.4±0.3	5.6±7.7	1.4±0.4	1.5±0.4 ²	5.0±3.7
LDL (mmol/L)	2.9±1.3	3.5±1.8 ¹	16.6±10.3	2.5±0.3	2.8±0.7	12.5±21.2
TG (mmol/L)	2.0±1.0	1.7±0.7	-12.5±16.5	1.5±0.7	1.1±0.5 ¹	-25.0±26.9
FFA (μmol/L)	407±288	415±240	18±71	465 ±187	461± 329	1.9 ±63
glycemia (mmol/L)	4.7±0.5	4.8±0.4	3.2±11.5	4.5±0.4	4.5±0.4	-0.4±7.7
Insulin (pmol/L)	11.6± 3.8	13.2±6.7	13.2±36.7	10.6±3.7	10.6±5.1	-2.6± 26.8
Adiponectin (μg/mL)	15.4±11.4	17.1±11.4	16.2± 25.8	19.5±7.4	20.8±3.2	15.2± 31.6
Leptin (ng/mL)	20.3±31.2	23.4±36.4	10.1±44.9	19.8±16.1	23.8±20.9	22.1±26.9

TG, triacylglycerol, FFA, free fatty acid. Data are expressed as mean ±SEM.

¹ p < 0.05

² p<0.01

Table 5 : plasma inflammatory markers at baseline and after 10 weeks of fish oil treatment.

	Group A (n=6)			group B (n=6)		
	Baseline	week 10	% change From Baseline	Baseline	week 10	% change From baseline
CRP (mg/L)	1.33±1.5	1.46±1.06	77±183	1.46±0.95	1.60±1.32	11.03±41.3
TNF α (pg/mL)	27.4±7.3	28.4±6.3	7.4±25	21.0±7.3	22.5±8.1	6.9±6.6
IL-6 (pg/mL)	14.7±9.3	10.2±7.5	-27.3±37.7	8.3±5.0	9.3±6.1	14.8±33.1

CRP, C reactive protein, TNF α , tumor necrosis factor, IL-6, interleukin 6. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Legends for figures

Figure 1: Effect of 10 weeks fish oil treatment on the expression of adipokines and adiponectin receptors 1 and 2 in subcutaneous adipose tissue.

Data are mean $\pm$ SEM, for baseline (black bars) for 10 weeks (open bars). Data are normalized for TATA box binding protein (TBP).

Figure 2: Effect of 10 weeks fish oil treatment on the expression of inflammation related genes in subcutaneous adipose tissue.

Data are mean $\pm$ SEM, for baseline (black bars) for 10 weeks (open bars). Data are normalized for TATA box binding protein (TBP).

MMP9, matrix metallo protease 9

CD 68, macrophage phagocytic activity marker

CD11c macrophage surface marker

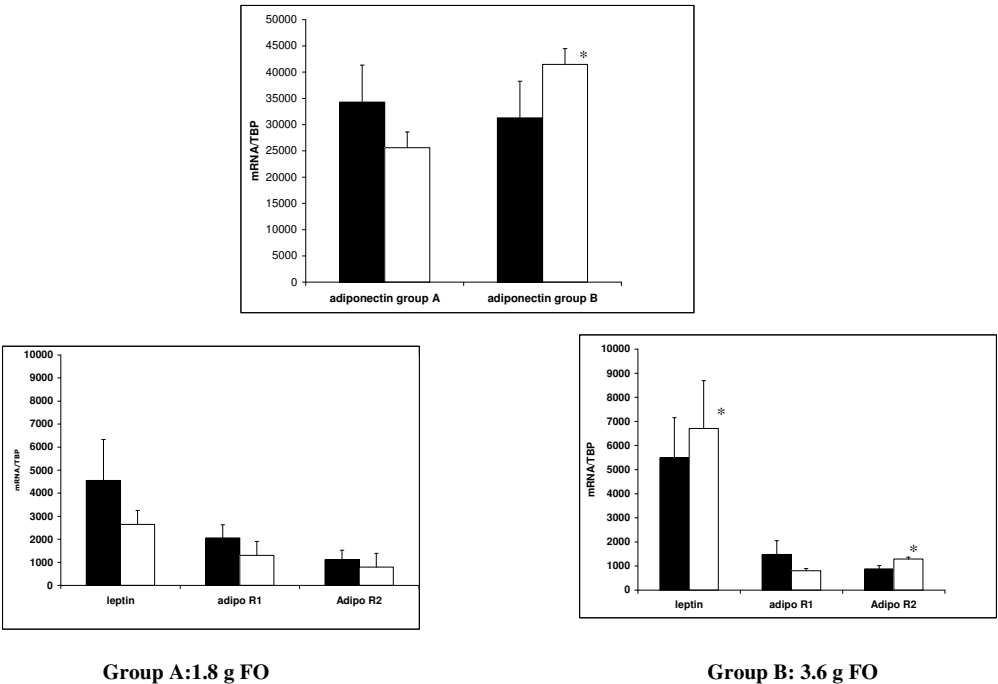
CD14 macrophage surface marker

IL-6 interleukine 6

MCP-1, monocyte chemotactic protein

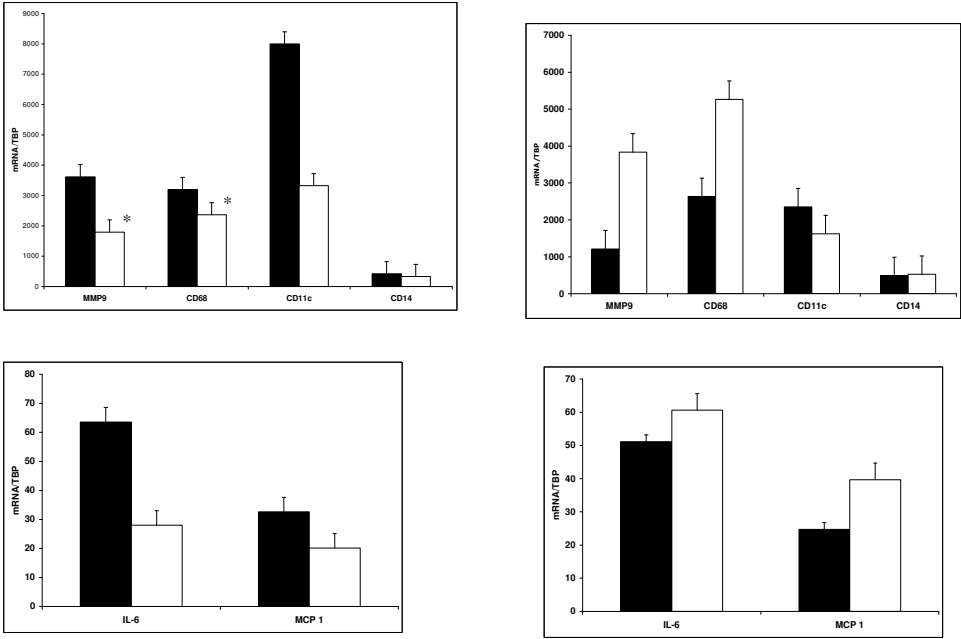
¹ p<0.05

Figure 1: Effect of 10 weeks fish oil treatment on the expression adipokines and adiponectin receptors 1 and 2 gene in subcutaneous adipose tissue.



ScholarOne support: (434)817 2040 ext.167

Figure 2: Effect of 10 weeks fish oil treatment on the expression of inflammation related gene in subcutaneous adipose tissue.



Group A:1.8 g FO

Group B: 3.6 g FO

ScholarOne support: (434)817 2040 ext.167

7.5 Autres résultats et discussion

Chez les patients insuffisants rénaux, nous avons vérifié l'impact de ces deux différentes doses d'huile de poisson sur les marqueurs de stress oxydant :

Marqueurs plasmatiques	Groupe A		Groupe B	
	basal	10 semaines	basal	10 semaines
Malonedialdéhyde (MDA) $\mu\text{mol/L}$	1.3 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2
Glutathion peroxydase (GPX) U/L	468,5 $\pm$ 90.1	412,8 $\pm$ 80.6	441,8 $\pm$ 70.1	452,8 $\pm$ 74.7
Superoxyde dismutase (SOD) U/mL	241.3 $\pm$ 91.1	296.3 $\pm$ 99.1	241.6 $\pm$ 11.2	261.0 $\pm$ 59.5

Quelle que soit la dose utilisée nous ne montrons pas d'augmentation des marqueurs de peroxydation lipidique ou de diminution d'anti oxydants avec la limite que ces marqueurs ne sont pas spécifiques de la peroxydation des AGPI n-3.

Il est ainsi possible qu'au niveau du tissu adipeux les doses modérées d'AGPI aient un effet bénéfique anti inflammatoire, alors que les doses importantes améliorent le profil lipidique mais ont plutôt un impact sur les adipokines. L'augmentation préférentielle d'adipo R2 est plutôt en faveur d'une activation de PPAR α , qu'une activation d'AMPK, mais la quantité limitée de tissu ne nous a pas permis de faire une quantification au niveau protéique. Nous ne pouvons cependant exclure que ces augmentations ne soient pas un processus de contre régulation face à un stress oxydant accru au niveau local tissulaire adipocytaire. Nous avons analysé l'expression de gènes ayant un rôle anti ou prooxydant dans le tissu adipeux. Alors que la supplémentation de doses modérées d'oméga 3 n'entraîne aucune modification des gènes qui ont été étudiés, l'expression de l'ARNm de MT2A (métallothionine 2A) et SOD1 (superoxyde dismutase) est augmentée après la supplémentation de 3,6 g d'oméga trois.

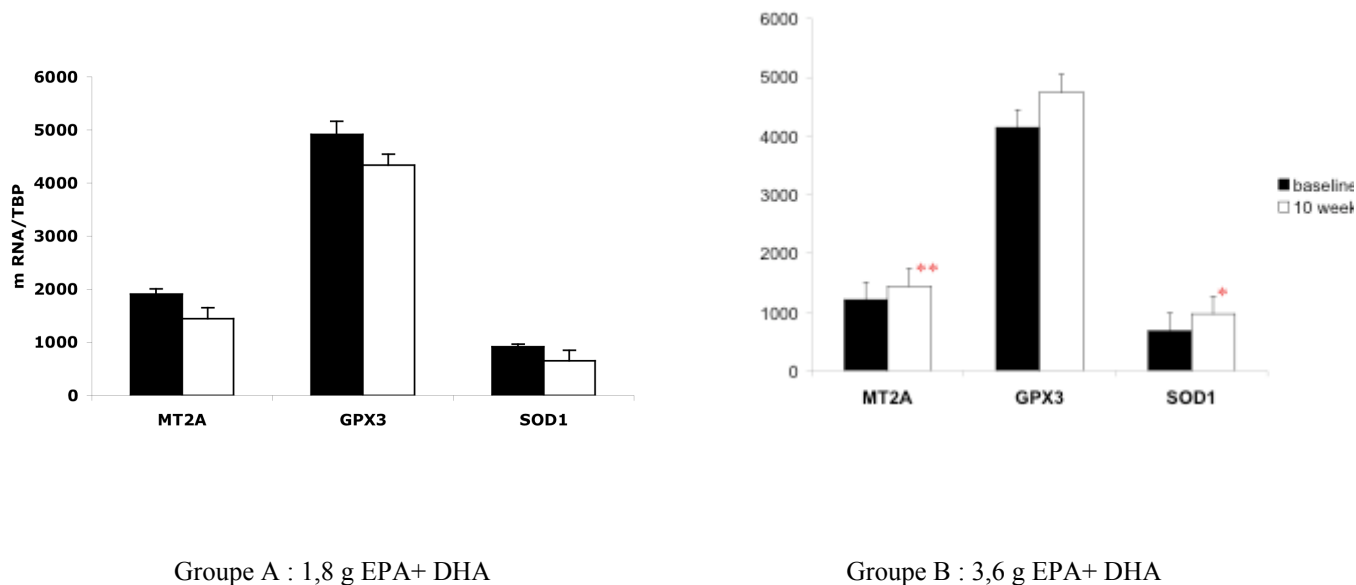


Figure 3: Etude de l'expression de gènes impliqués dans la génération de ROS.

- $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. MT2A metallothionein 2A, GPX3 glutathion peroxydase 3, SOD1 superoxyde dismutase 1

Nous montrons ainsi une augmentation des défenses anti oxydants avec les fortes doses d'oméga trois. MT2A ou metallothioneine code pour une protéine de bas poids moléculaire impliquée dans la réponse au stress. Une augmentation de l'expression de MT2A au niveau du tissu adipeux a été rapportée chez des sujets obèses comparés à des témoins mais sans effet d'un régime hypocalorique de deux semaines (121). De la même manière, Nakao et al ont montré une augmentation de l'expression de SOD dans le tissu adipeux de souris obèses suggérant un phénomène compensatoire d'adaptation à un stress oxydant accru (122). Dans notre étude nous ne pouvons affirmer avec certitude que cette augmentation d'expression de MT-2A et SOD est liée à une augmentation de stress oxydant :

- Aucun des marqueurs de peroxydation que nous avons utilisé n'est altéré

- Nous trouvons une augmentation concomittente d'expression d'adiponectine qui est plutôt inhibée lors de situation de stress oxydant accru. Ainsi, les études in vitro montrent que l'administration de 4 Hydroxynonenal (4-HNE) un produit de peroxydation lipidique ou de peroxyde d'hydrogene H₂O₂ sur des cellules 3T3 en culture entraine une inhibition de l'expression d'adiponectine (123, 124) et de leptine. Au cours de l'obésité qui est associée à un stress oxydant au niveau des adipocytes, l'expression d'adiponectine est inhibée.
- Des études in vitro seront nécessaires pour déterminer l'impact des AGPI n-3 sur le niveau de stress oxydant du tissu adipeux en fonction des doses.

8 Conclusions et perspectives

L'apport de AGPI n-3 semble avoir un bénéfice incontestable chez les patients à risque cardiovasculaire comme ceux présentant une maladie rénale chronique. Un certain nombre d'études récentes montrent que ces effets protecteurs sont le fait de doses modérées d'AGPI n-3, il est possible qu'il existe une dissociation entre l'effet antilipémiant et l'effet immunomodulateur au cours de l'insuffisance rénale. Il est donc important de :

- Confirmer ces constatations sur un modèle animal et en étudier les mécanismes cellulaires précis
- Vérifier la faisabilité et l'effet métabolique d'une modification nutritionnelle visant à diminuer le rapport AGPI n-6/n-3 chez les patients souffrant de MRC.
- Réaliser des études de plus longues durées et sur une population plus large d'insuffisants rénaux chroniques pour vérifier si les doses modérées s'accompagnent de bénéfices cliniques avec diminution de la mortalité cardio-vasculaire.
- Vérifier l'effet spécifique de DHA et EPA sur l'inflammation et la fonction adipocytaire chez ces patients.

9 Références

1. **Arterburn LM, Hall EB, Oken H.** Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6 Suppl):1467S-1476S.
2. **Martin A.** The "apports nutritionnels conseillés (ANC)" for the French population. *Reprod Nutr Dev.* 2001;41(2):119-28.
3. **Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ.** Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002;106(21):2747-57.
4. **James MJ, Gibson RA, Cleland LG.** Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(1 Suppl):343S-8S.
5. **Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN.** Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007;447(7146):869-74.
6. **Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE.** Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):349-61.
7. **Todoric J, Loffler M, Huber J, et al.** Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia.* 2006;49(9):2109-19.
8. **Kabir M, Skurnik G, Naour N, et al.** Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(6):1670-9.
9. **Adkins Y, Kelley DS.** Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 21(9):781-92.
10. **Burdge GC, Wootton SA.** Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr.* 2002;88(4):411-20.
11. **Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC, Calder PC.** Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc Nutr Soc.* 2008;67(1):19-27.
12. **Bolton-Smith C, Woodward M, Tavendale R.** Evidence for age-related differences in the fatty acid composition of human adipose tissue, independent of diet. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51(9):619-24.
13. **Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M.** Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(11):1621-30.
14. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet.* 1999;354(9177):447-55.
15. **Siscovick DS, Raghunathan T, King I, et al.** Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(1 Suppl):208S-12S.
16. **Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, et al.** Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *Jama.* 1998;279(1):23-8.
17. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama.* 2001;285(19):2486-97.
18. **Alberti KG, Zimmet P, Shaw J.** Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006;23(5):469-80.

19. **Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow JL.** Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. Chronic and acute effects of fat saturation on postprandial lipoprotein metabolism. *J Clin Invest.* 1988;82(6):1884-93.
20. **Mori TA, Woodman RJ.** The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(2):95-104.
21. **Lombardo YB, Hein G, Chicco A.** Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids.* 2007;42(5):427-37.
22. **Lombardo YB, Chicco AG.** Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem.* 2006;17(1):1-13.
23. **Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS.** Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science.* 1987;237(4817):885-8.
24. **Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, et al.** Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 2006;49(2):394-7.
25. **Delarue J, Couet C, Cohen R, Brechot JF, Antoine JM, Lamisse F.** Effects of fish oil on metabolic responses to oral fructose and glucose loads in healthy humans. *Am J Physiol.* 1996;270(2 Pt 1):E353-62.
26. **Krebs JD, Browning LM, McLean NK, et al.** Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(10):1535-44.
27. **Nettleton JA, Katz R.** n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc.* 2005;105(3):428-40.
28. **Hartweg J, Perera R, Montori V, Dinneen S, Neil HA, Farmer A.** Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(1):CD003205.
29. **Breslow JL.** n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6 Suppl):1477S-1482S.
30. **Guillot N, Caillet E, Laville M, Calzada C, Lagarde M, Vericel E.** Increasing intakes of the long-chain {omega}-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J.* 2009.
31. **Galgani JE, Moro C, Ravussin E.** Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(5):E1009-17.
32. **Kelley DE, Mandarino LJ.** Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000;49(5):677-83.
33. **Erion DM, Shulman GI.** Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med.* 16(4):400-2.
34. **Ukropcova B, McNeil M, Sereda O, et al.** Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1934-41.
35. **Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F.** Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21(8):637-43.
36. **Guebre-Egziabher F, Rabasa-Lhoret R, Bonnet F, et al.** Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62(11):1287-93.
37. **Hessvik NP, Bakke SS, Fredriksson K, et al.** Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids. *J Lipid Res.*
38. **Froyland L, Madsen L, Vaagenes H, et al.** Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *J Lipid Res.* 1997;38(9):1851-8.

39. **Calzada C, Colas R, Guillot N, et al.** Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis*;208(2):467-72.
40. **Sijben JW, Calder PC.** Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc.* 2007;66(2):237-59.
41. **Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K.** Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1740(2):266-86.
42. **Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, et al.** Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol.* 2007;47(5):711-7.
43. **Vuppalanchi R, Cummings OW, Saxena R, et al.** Relationship among histologic, radiologic, and biochemical assessments of hepatic steatosis: a study of human liver samples. *J Clin Gastroenterol.* 2007;41(2):206-10.
44. **Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, et al.** Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol.* 2008;48(2):300-7.
45. **Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, et al.** Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *Faseb J.* 2009;23(6):1946-57.
46. **Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, et al.** Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology.* 2003;38(6):1529-39.
47. **Capanni M, Calella F, Biagini MR, et al.** Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(8):1143-51.
48. **Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T.** Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42(4):413-8.
49. **Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Demeure O, Christian B.** Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids.* 2008;153(1):3-13.
50. **El-Badry AM, Graf R, Clavien PA.** Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? *J Hepatol.* 2007;47(5):718-25.
51. **Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foulfelle F.** Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12737-42.
52. **Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD.** Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23577-83.
53. **Zhao A, Yu J, Lew JL, Huang L, Wright SD, Cui J.** Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol.* 2004;23(8):519-26.
54. **Roth U, Jungermann K, Kietzmann T.** Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes. *Biochem J.* 2002;365(Pt 1):223-8.
55. **Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, et al.** Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2843-54.
56. **Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, et al.** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002;415(6869):339-43.
57. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8(11):1288-95.

58. **Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV.** The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med.* 1993;328(4):238-44.
59. **Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D.** N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev.* 2004;44(3):289-99.
60. **Flachs P, Horakova O, Brauner P, et al.** Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia.* 2005;48(11):2365-75.
61. **Fasshauer M, Paschke R.** Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia.* 2003;46(12):1594-603.
62. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87-91.
63. **Shoelson SE, Herrero L, Naaz A.** Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2169-80.
64. **Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al.** Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4196-200.
65. **Bastard JP, Lagathu C, Caron M, Capeau J.** Point-counterpoint: Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol.* 2007;102(2):821-2; author reply 825.
66. **Ahima RS.** Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2380-3.
67. **Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG.** AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005;1(1):15-25.
68. **Flier JS.** Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1407-13.
69. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al.** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(1):79-83.
70. **Ouchi N, Walsh K.** Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta.* 2007;380(1-2):24-30.
71. **Heidemann C, Sun Q, van Dam RM, et al.** Total and high-molecular-weight adiponectin and resistin in relation to the risk for type 2 diabetes in women. *Ann Intern Med.* 2008;149(5):307-16.
72. **Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, et al.** Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8748-55.
73. **Capeau J.** The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. *J Hepatol.* 2007;47(5):736-8.
74. **Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al.** Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 2007;13(3):332-9.
75. **Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B.** Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2282-9.
76. **Herzberg GR, Skinner C.** Differential accumulation and release of long-chain n-3 fatty acids from liver, muscle, and adipose tissue triacylglycerols. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997;75(8):945-51.
77. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS.** Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78(3):783-809.

78. **Kim HK, Della-Fera M, Lin J, Baile CA.** Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 2006;136(12):2965-9.
79. **Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, et al.** Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids.* 2004;39(12):1177-85.
80. **Huber J, Loffler M, Bilban M, et al.** Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(6):1004-13.
81. **Forman BM, Chen J, Evans RM.** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4312-7.
82. **Yang X, Smith U.** Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia.* 2007;50(6):1127-39.
83. **Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, et al.** Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes.* 2006;55(4):924-8.
84. **Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, et al.** Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(2):R486-R494.
85. **Itoh M, Suganami T, Satoh N, et al.** Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(9):1918-25.
86. **Trebbie T, Arden NK, Stroud MA, et al.** Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *Br J Nutr.* 2003;90(2):405-12.
87. **Wallace FA, Miles EA, Calder PC.** Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 2003;89(5):679-89.
88. **Beddhu S, Kimmel PL, Ramkumar N, Cheung AK.** Associations of metabolic syndrome with inflammation in CKD: results From the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis.* 2005;46(4):577-86.
89. **DeFronzo RA, Alvestrand A, Smith D, Hendler R, Hendler E, Wahren J.** Insulin resistance in uremia. *J Clin Invest.* 1981;67(2):563-8.
90. **DeFronzo RA, Tobin JD, Rowe JW, Andres R.** Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to glucose and tissue sensitivity to insulin. *J Clin Invest.* 1978;62(2):425-35.
91. **Shinohara K, Shoji T, Emoto M, et al.** Insulin resistance as an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(7):1894-900.
92. **Chonchol M, Scragg R.** 25-Hydroxyvitamin D, insulin resistance, and kidney function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Kidney Int.* 2007;71(2):134-9.
93. **Bailey JL, Zheng B, Hu Z, Price SR, Mitch WE.** Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(5):1388-94.
94. **Kasiske BL.** Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S142-56.
95. **Mori Y, Hirano T, Nagashima M, Shiraishi Y, Fukui T, Adachi M.** Decreased peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression is associated with dyslipidemia in a rat model of chronic renal failure. *Metabolism.* 2007;56(12):1714-8.

96. **Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, et al.** Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):134-41.
97. **Heimbürger O, Lonnqvist F, Danielsson A, Nordenstrom J, Stenvinkel P.** Serum immunoreactive leptin concentration and its relation to the body fat content in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(9):1423-30.
98. **Axelsson J, Rashid Qureshi A, Suliman ME, et al.** Truncal fat mass as a contributor to inflammation in end-stage renal disease. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(5):1222-9.
99. **Axelsson J, Moller HJ, Witas A, et al.** Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;48(6):916-25.
100. **Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, et al.** Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004;65(3):1009-16.
101. **Bolton CH, Downs LG, Victory JG, et al.** Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(6):1189-97.
102. **Pupim LB, Himmelfarb J, McMonagle E, Shyr Y, Ikizler TA.** Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int.* 2004;65(6):2371-9.
103. **Raj DS, Dominic EA, Pai A, et al.** Skeletal muscle, cytokines, and oxidative stress in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2005;68(5):2338-44.
104. **Ramos LF, Shintani A, Ikizler TA, Himmelfarb J.** Oxidative stress and inflammation are associated with adiposity in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(3):593-9.
105. **D'Apolito M, Du X, Zong H, et al.** Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest.* 2003;112(1):203-13.
106. **Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C.** Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999;55(2):648-58.
107. **Kaizu Y, Kimura M, Yoneyama T, Miyaji K, Hibi I, Kumagai H.** Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;31(1):93-100.
108. **Bologa RM, Levine DM, Parker TS, et al.** Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(1):107-14.
109. **Axelsson J, Bergsten A, Qureshi AR, et al.** Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney Int.* 2006;69(3):596-604.
110. **Saifullah A, Watkins BA, Saha C, Li Y, Moe SM, Friedman AN.** Oral fish oil supplementation raises blood omega-3 levels and lowers C-reactive protein in haemodialysis patients--a pilot study. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(12):3561-7.
111. **Svensson M, Schmidt EB, Jorgensen KA, Christensen JH.** The effect of n-3 fatty acids on lipids and lipoproteins in patients treated with chronic haemodialysis: a randomized placebo-controlled intervention study. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(9):2918-24.
112. **Svensson M, Christensen JH, Solling J, Schmidt EB.** The effect of n-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and blood pressure in patients with CRF. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(1):77-83.
113. **K/DOQI clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patients.** *Am J Kidney Dis.* 2005;45(4 Suppl 3):S1-153.
114. **Rasic-Milutinovic Z, Perunicic G, Pljesa S, et al.** Effects of N-3 PUFAs supplementation on insulin resistance and inflammatory biomarkers in hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2007;29(3):321-9.

115. **Mori TA, Burke V, Puddey I, et al.** The effects of [omega]3 fatty acids and coenzyme Q10 on blood pressure and heart rate in chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *J Hypertens*. 2009;27(9):1863-72.
116. **Ando M, Sanaka T, Nihei H.** Eicosapentanoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation of LDL in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(10):2177-84.
117. **Cappelli P, Di Liberato L, Stuard S, Ballone E, Albertazzi A.** N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in chronic progressive renal disease. *J Nephrol*. 1997;10(3):157-62.
118. **Donadio JV, Jr., Bergstralh EJ, Offord KP, Spencer DC, Holley KE.** A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy. Mayo Nephrology Collaborative Group. *N Engl J Med*. 1994;331(18):1194-9.
119. **Donadio JV, Jr., Grande JP, Bergstralh EJ, Dart RA, Larson TS, Spencer DC.** The long-term outcome of patients with IgA nephropathy treated with fish oil in a controlled trial. Mayo Nephrology Collaborative Group. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(8):1772-7.
120. **Schmitz PG, McCloud LK, Reikes ST, Leonard CL, Gellens ME.** Prophylaxis of hemodialysis graft thrombosis with fish oil: double-blind, randomized, prospective trial. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(1):184-90.
121. **Do MS, Nam SY, Hong SE, et al.** Metallothionein gene expression in human adipose tissue from lean and obese subjects. *Horm Metab Res*. 2002;34(6):348-51.
122. **Nakao C, Ookawara T, Sato Y, et al.** Extracellular superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice. *Free Radic Res*. 2000;33(3):229-41.
123. **Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, et al.** Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(7):882-9.
124. **Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, et al.** Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(2):624-32.

RESUME en français

Les oméga trois ont un bénéfice prouvé dans la prévention de maladie cardiovasculaire et l'inflammation. Un apport optimal peut être réalisé avec des modifications diététiques simples permettant d'avoir un enrichissement des membranes cellulaires et un effet métabolique. Le tissu adipeux de part son rôle important dans la genèse du syndrome métabolique semble être une cible importante du traitement par oméga trois.

Les patients avec une maladie rénale chronique (MRC) ont un risque cardiovasculaire accru et cumulent les perturbations métaboliques comme le syndrome métabolique et un état micro inflammatoire. Des doses supra physiologiques d'oméga trois ont été utilisés dans le passé dans des études de prévention rénale ou traitement de dyslipidémie. Or l'effet métabolique en fonction de la dose d'oméga 3 n'est pas connu. En accord, avec les études chez le sujet sain, en fonction de la dose administrée, les oméga 3 ont un impact différent métabolique et sur l'expression génique. Des études complémentaires sont nécessaires pour vérifier la faisabilité et l'impact métabolique d'une modification de régime afin de diminuer le rapport n-6/n-3, ainsi que l'effet à long terme des oméga trois chez ces patients. Par ailleurs, les mécanismes impliqués dans les différences de dose réponse devront être caractérisés sur un modèle animal.

TITRE en anglais

Metabolic effect of omega 3 fatty acids in health and chronic kidney disease

RESUME en anglais

Omega 3 fatty acids play an important modulatory role in metabolic and inflammatory responses, the progression of atherosclerosis and gene expression. Recent studies suggest their beneficial impact on adipocyte morphology and function. Chronic kidney disease (CKD) patients have an increased cardiovascular morbi-mortality and suffer from a cluster of metabolic disorders. On the basis of previous studies there are reasons to suggest that omega 3 supplementation may offer a host of benefits to CKD patients. Unfortunately, published studies on the effect of such supplementation are characterized by supra physiological omega 3 doses, that may be difficult to implement for extended periods in one hand and in the other hand the metabolic effect of different doses of omega 3 hasn't been studied in detail. Simple dietary modifications can help achieve the recommended n-6/n-3 ratio in healthy subjects. In CKD patients supplementation with n-3 shows a differential dose response effect. Further studies are required to test the faisability and metabolic impact of dietary modifications in order to decrease n-6/n-3 ratio and to assess the long term effect of omega supplementation in CKD patients. Finally the molecular pathways implicated in this differential dose response should be assessed in animal models.

DISCIPLINE

Régulation Nutrition métabolisme Diabète

MOTS-CLES

Acides gras polyinsaturés n-3, maladies rénales chroniques, adipokines, inflammation, adipocytes