



HAL
open science

Les lipides polaires laitiers modulent l'absorption lipidique et la lipémie postprandiale : conséquences métaboliques chez la souris

Manon Lecomte

► To cite this version:

Manon Lecomte. Les lipides polaires laitiers modulent l'absorption lipidique et la lipémie postprandiale : conséquences métaboliques chez la souris. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1012 . tel-02918138

HAL Id: tel-02918138

<https://theses.hal.science/tel-02918138>

Submitted on 20 Aug 2020

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.

THÈSE

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

Discipline : Biochimie

Par

Manon LECOMTE

**Les lipides polaires laitiers modulent
l'absorption lipidique et la lipémie postprandiale :
conséquences métaboliques chez la souris**

Soutenue publiquement le **29 janvier 2016**

Directrice de thèse : **Dr Marie-Caroline MICHALSKI**

Membres du jury :

Pr. Agnès Girard-Egrot, Professeur, Université Lyon 1	Président
Pr. Isabelle Niot, Professeur, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon	Rapporteur
Dr. Jean-Charles Martin, Directeur de Recherche INRA, Marseille	Rapporteur
Dr. Sabine Danthine, Professeur Associé, Université de Liège, Belgique	Examineur
Mme Agnès Méheust, Danone Nutricia Research, Paris	Examineur
Dr. Marie-Caroline Michalski, Directeur de Recherche INRA, Lyon	Directrice de thèse
Pr. Corinne Malpuech-Brugère, Professeur, Université d'Auvergne	Membre invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

En premier lieu, Je tiens à remercier le Dr. **Hubert Vidal**, directeur du laboratoire CarMeN, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant ces trois années de thèse.

Je remercie également les directeurs de l'équipe 4 les Prs. **Michel Lagarde** et **Philippe Moulin**, pour leurs conseils et leur avis extérieurs sur mes travaux toujours intéressants et constructifs.

Je remercie le Pr. **Agnès Girard-Egrot** d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

J'adresse mes remerciements au Pr. **Isabelle Niot** et Dr. **Jean-Charles Martin** pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Un grand merci aux membres du jury, Dr. **Sabine Danthine**, Mme **Agnès Méheust** et le Pr. **Corinne Malpuech-Brugère**, pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je tiens également à remercier les membres de mes comités de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les critiques constructives qu'ils ont faites sur mon projet de thèse.

Mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse Dr. **Marie-Caroline Michalski** pour avoir accepté ma candidature, pour m'avoir fait confiance et guidée tout au long de ce projet. De notre première rencontre à Los Angeles jusqu'à aujourd'hui, merci d'avoir partagé ces années avec moi, de m'avoir accordé du temps et de m'avoir transmis ta passion pour la science. Ta bienveillance et ton dynamisme ont fait de cette thèse une expérience personnelle réussie et très enrichissante d'un point de vue scientifique bien sûr mais également d'un point de vue humain.

Un très grand merci au Dr. **Fabienne Laugerette** pour avoir encadré une partie de mes travaux. Merci pour ton importante aide scientifique et technique ainsi que pour ton soutien et tes encouragements. Nos discussions m'ont toujours permis d'avancer dans la bonne direction.

Je remercie grandement pour leur implication dans ce travail tant au niveau de la réflexion scientifique que de la réalisation les Drs. **Armelle Penhoat**, **Alain Géoën**, **Pascale Plaisancié**, **Marion Létisse** et **Emmanuelle Meugnier**.

Un très grand merci à **Annie Durand** et **Gaëlle Pineau** pour leur aide précieuse sur la réalisation des différentes analyses. Merci à **Patricia Daira** pour sa formation aux analyses lipidiques.

Je remercie également **Virginie Tafani** et **Marine Milard** qui ont contribué à l'avancement de ces travaux pendant leur stage. Marine je te souhaite tout le meilleur pour ces trois années de thèse qui commencent.

Je remercie Dr. **Claire Bourlieu**, **Mathilde Claude** et **Olivia Ménard** du laboratoire de Science et Technologie du lait et de l'œuf à Rennes pour leur collaboration.

Merci également aux Drs. **Leslie Couédelo**, **Carole Vaysse** et **Florent Joffre** de l'ITERG à Pessac pour leur collaboration sur l'étude de régime et au Pr. **Corinne Malpuech-Brugère** de l'UNH à Clermont-Ferrand pour sa collaboration sur la partie clinique.

Je tiens également à remercier Dr. **David Cheillan** pour les analyses de sphingolipidomiques et les discussions de résultats toujours rigoureuses et très intéressantes.

Je remercie tous les membres du **Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes** de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche clinique ! Un très grand merci aux infirmières et aux médecins qui ont participé à la réalisation de l'étude VALOBAB Digestion. Merci également aux filles de la plateforme d'analyses.

Je remercie chaleureusement Dr. **Cécile Vors** pour m'avoir guidée dans cet univers, pour ses nombreux conseils et son aide à tous les niveaux.

Je tiens à remercier le Dr. **Yves François** et le Pr. **Eddy Cotte** du service de chirurgie digestive de l'hôpital Lyon-Sud pour leur aide très précieuse dans le recrutement des volontaires de l'étude VALOBAB Digestion.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Maud Arnal-Levron** et **Charlotte Jouvène**, mes co-bureaux qui sont devenues au fil de ces trois années de véritables amies. Merci pour votre soutien, pour votre bonne humeur et pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors. Sans vous cela n'aurait pas été la même expérience !

Merci à également à **Jérémie Bruno**, **Huy Quang Le** et **Bérengère Benoit** pour les bons moments partagés.

Merci à tous les autres membres du laboratoire, que j'ai connu de près ou de loin, qui eux aussi ont contribué à mon travail et/ou à mon bien-être dans ces années de thèse.

Je remercie chaleureusement **mes parents** et **mon grand frère** (et sa petite famille !) qui m'ont toujours soutenue dans mes études, moi la scientifique de la famille ! Malgré la distance qui nous sépare, merci de votre écoute et de votre aide.

Merci également à mes amis pour leur soutien et leurs encouragements. G8 Forever !

Enfin je remercie de tout mon cœur **Jérôme**. Merci pour les discussions scientifiques, les répétitions de présentation, les sauvetages informatiques et surtout ton soutien sans faille. Tu as toujours su trouver les mots pour me donner confiance en moi et ainsi m'aider à franchir toutes les étapes de cette thèse. Merci d'être à mes côtés...

Résumé

Les maladies métaboliques d'origine nutritionnelle sont caractérisées par un métabolisme des lipides perturbé incluant une hyperlipémie postprandiale et une inflammation métabolique. Les lipides polaires (LP) sont des agents émulsifiants utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Récemment, un intérêt croissant s'est développé autour des effets potentiellement bénéfiques des LP issus du lait, encore peu utilisés. Dans ce contexte, le but de notre étude a été d'évaluer l'impact de l'utilisation des LP laitiers (i) comme émulsifiant sur la digestion, l'absorption et le métabolisme postprandial des lipides, et (ii) à plus long terme sur l'adiposité et l'inflammation dans le tissu adipeux. Nous avons également évalué la spécificité des LP laitiers par rapport aux LP de soja, actuellement les plus utilisés comme ingrédient dans l'industrie, sur l'ensemble de ces phénomènes.

Chez la souris, les LP laitiers induisent une cinétique de lipémie postprandiale plus précoce en comparaison avec les LP de soja, associée à des modifications de l'expression de gènes du métabolisme lipidique dans l'intestin et à une modulation de la digestion des lipides. Les LP laitiers induisent notamment une augmentation de la lipolyse intestinale *in vitro*. De plus, les chylomicrons sécrétés durant le pic de lipémie sont plus petits et plus enrichis en sphingomyéline (SM) avec les LP laitiers. *In vitro*, l'incubation de SM laitière sur des cellules Caco-2/TC7 module la sécrétion des lipides et les gènes du métabolisme lipidique, suggérant que les effets observés avec les LP laitiers chez la souris seraient dus au moins en partie à leur richesse en SM. D'autre part, la substitution d'une partie des lipides d'un régime hyper-lipidique par des LP laitiers ne modifie pas le stockage des lipides dans le foie et le tissu adipeux contrairement aux LP de soja qui induisent une augmentation des lipides hépatiques, des adipocytes et des marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux. Par ailleurs, Les LP laitiers induisent une diminution de l'expression génique de marqueurs de l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux et une augmentation du nombre de cellules à gobelet dans le côlon, suggérant une barrière intestinale renforcée.

L'ensemble de ces travaux démontre que les LP laitiers, par rapport aux LP de soja, stimulent la digestion des lipides et induisent une cinétique plus rapide de lipémie postprandiale. A long terme ils n'induisent pas les altérations métaboliques du tissu adipeux observées en présence de LP de soja dans un régime hyper-lipidique. L'importance pratique de ces résultats ne devrait pas être sous-estimée étant donné l'utilisation importante des LP dans l'industrie agroalimentaire. Nos résultats incitent à poursuivre l'étude des effets des LP laitiers chez l'Homme, en particulier dans le contexte du développement de stratégies nutritionnelles capables de limiter ou de prévenir les désordres métaboliques associés aux états d'obésité.

Mots Clés : Nutrition, Maladie métabolique, Lipémie, Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Lait, Lécithine, Emulsion, Intestin, Absorption, Digestion, Barrière intestinale.

Milk polar lipids modulate lipid absorption and postprandial lipemia: metabolic consequences in mice.

Abstract

Metabolic diseases are characterized by an altered lipid metabolism including prolonged postprandial hyperlipemia, enhanced adiposity and metabolic inflammation. Numerous food products contain polar lipid (PL) emulsifiers that could impact these risk factors. Notably, interest is growing regarding potential beneficial effects of milk PL, barely used by the food industry. In this context, we evaluated the impact of using PL from milk (MPL) (i) acutely on lipid digestion and postprandial lipemia and (ii) in the longer term in addition to a high fat diet on adiposity and adipose tissue inflammation. We compared MPL to soybean PL (SPL) that is currently the main commercial source of PL.

In mice, an emulsion stabilized by MPL results in a more rapid postprandial lipemia than an emulsion stabilized by SPL, with an early increase in lipemia and a faster clearance. Differences in lipemia can originate from differential kinetics of lipid hydrolysis in the mouse gut, as an increase intestinal TG hydrolysis is observed *in vitro*. Moreover, early MPL-derived chylomicrons are smaller and contain more sphingomyelin than SPL-derived chylomicrons. *In vitro*, incubation of milk SM on Caco-2/TC7 cells modulate lipid secretion and gene expression of lipid metabolism-related proteins, suggesting that MPL effects would be due, at least in part, to their high content in SM. In the longer term, compared with HF diet, HF-SPL diet increases hepatic lipids, white adipose tissue (WAT) mass, with larger and more numerous adipocytes and increases expression of pro-inflammatory adipokines. This is not observed with HF-MPL diet despite similar dietary intakes. HFP-MPL mice have a lower expression in WAT of CD68, marker of macrophage infiltration and more numerous goblet cells in the colon. This result suggests that MPL effects are associated with an improved gut barrier function, possibly due to the influx of specific SM derived lipids in the colon.

Postprandial lipemia in mice can be modulated by emulsifying with MPL compared with SPL, partly through differences in chylomicron assembly, and intestinal TG hydrolysis rate. Moreover unlike SPL, MPL in a high fat diet do not induce WAT hypertrophy and inflammation but increase colonic goblet cells. The practical importance of these finding should not be underrated considering the wide use of polar lipid emulsifiers in the food industry. Further explorations will now be deserved in humans to evaluate the potential of using MPL ingredients more largely as a strategy to lower obesity-related metabolic inflammation.

Keywords : Nutrition, Metabolic disease, Lipemia, Lipid, Phospholipid, Sphingolipid, Milk, Lecithin, Emulsion, Intestine, Absorption, Digestion, Gut barrier.

Publications, communications, bourses, prix et encadrement

❖ Publications issus du travail de thèse

Lecomte, M., Bourlieu, C., Meugnier, E., Penhoat, A., Cheillan, D., Pineau, G., Loizon, E., Trauchessec, M., Claude, M., Menard, O., Géoën, A., Laugerette, F., & Michalski, M. C. Milk polar lipids affect in vitro digestive lipolysis and postprandial lipid metabolism in mice. **Journal of Nutrition**, 2015 July; 145(8), 1770-1777.

Lecomte, M., Couëdelo, L., Meugnier, E., Plaisancié, P., Létisse, M., Bérengère, B., Gabert, L., Penhoat, A., Durand, A., Pineau, G., Joffre, F., Géoën, A., Vaysse, C., Laugerette, F., & Michalski, M. C. Dietary emulsifiers from milk and soybean differently impact adiposity and inflammation in association with modulation of colonic goblet cells in high-fat fed mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2016 March; 60(3): 609-620.

❖ Autre publication

Couëdelo, L., Amara, S., **Lecomte, M.**, Meugnier, E., Monteil, J., Fonseca, L., Pineau, G., Cansell, M., Carriere, F., Michalski, M. C., & Vaysse, C. Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. **Food and Function**, 2015 April; 6(5), 1726-1735.

❖ Travaux présentés sous forme de poster ou de communication orale

Lecomte M., Couëdelo L, Meugnier E, Plaisancié P, Létisse M, Bourlieu C, Pineau G, Claude M, Joffre F, Géoën A, Vaysse C, Michalski MC. Emulsifiants alimentaires : les lipides polaires du lait et du soja impactent différemment la lipémie postprandiale, l'adiposité et l'inflammation chez la souris. **Communication orale.** Journée de l'école doctorale EDISS, Lyon. Octobre 2015

Lecomte M., Couëdelo L, Meugnier E, Plaisancié P, Létisse M, Bourlieu C, Pineau G, Claude M, Joffre F, Géoën A, Vaysse C, Michalski MC. Milk vs soybean polar lipids modulate postprandial lipemia and high-fat diet-induced adiposity in mice. *Poster commenté par MC Michalski.* FENS congress, Berlin, Allemagne. Octobre 2015

Michalski MC, **Lecomte M.**, Couëdelo L, Meugnier E, Plaisancié P, Létisse M, Bourlieu C, Pineau G, Claude M, Joffre F, Géoën A, Vaysse C. Milk vs soybean polar lipids modulate postprandial lipemia and high-fat diet-induced adiposity in mice. *Communication orale par MC Michalski.* IDF World Dairy Summit, Vilnius, Lituanie. Septembre 2015

Lecomte M., Bourlieu C, Pineau G, Géoën A, Claude M, Laugerette F, Michalski MC. Milk vs soybean polar lipids as emulsifier: faster lipid metabolism through greater emulsion lipolysis. **Poster.** Experimental Biology, Boston, Etats-Unis. Mars 2015

Lecomte M, Bourlieu C, Claude M, Géoën A, Laugerette F, Michalski MC. Impact of dietary polar lipids of different sources on *in vitro* digestive lipolysis and intestinal lipid absorption in mice. **Poster**. Présenté aux congrès suivants :

- Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Lyon. Novembre 2014
- Journée scientifique de CENS, Lyon. Octobre 2014
- Euro Fed Lipid Congress, Montpellier. Septembre 2014
- Journée de l'école doctorale EDISS, Lyon. Septembre 2014

Lecomte M, Bourlieu C, Pineau G, Claude M, Géoën A, Laugerette F, Michalski MC. Lipides polaires alimentaires : impact sur l'absorption et le métabolisme lipidique postprandial. **Communication orale**. Journée scientifique de l'ARC 1 santé, l'Isle-d'abeau. Septembre 2014

Lecomte M, Bourlieu C, Pineau G, Claude M, Géoën A, Laugerette F, Michalski MC. Impact de différents lipides polaires alimentaires sur l'absorption lipidique intestinale : études *in vitro* sur cellules Caco-2 et *in vivo* chez la souris. **Communication orale**. 1ères Assises de Nutrition et de Métabolisme, Saint Galmier. Octobre 2013

Lecomte M, Laugerette F, Pineau G, Bourlieu C, Géoën A, Michalski MC. Impact de différents lipides polaires alimentaires sur l'absorption lipidique intestinale : études *in vitro* sur cellules caco-2 et *in vivo* chez la souris. **Poster**. Journée de l'école doctorale EDISS, Lyon. Septembre 2013

❖ Bourse

Obtention d'une bourse de voyage de la Société Française de Nutrition d'un montant de 800 euros pour ma participation au congrès « Experimental Biology » à Boston.

❖ Prix

Prix de la Communication Orale lors de la 20^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences et Santé, Lyon.

❖ Stagiaires

- Encadrement : Mathilde Claude, mobilité dans l'équipe au cours de son stage de master 2 recherche réalisé au laboratoire STLO de Rennes dans le cadre du M2 nutrition humaine de l'ENSCBP, Bordeaux. **2 semaines (juillet 2013)**
- Encadrement : Virginie Tafani, stage de DUT 1ère année de l'IUT Lyon 1 département génie biologique. **6 semaines (juin-juillet 2014)**
- Aide et suivi : Marine Milard, stages de M1 et de M2 de l'Université Lyon 1. **2014-2015**

Abréviation

A → C

ACBP	Acyl-Coenzyme A Binding Protein
ADN_c	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
AG	Acide Gras
AGI	Acide Gras Insaturé
AGL	Acide Gras Libre
AGLC	Acide Gras à Chaîne Longue
AGMI	Acide Gras Monoinsaturé
AGNE	Acide Gras Non Estérifié
AGPI	Acide Gras Polyinsaturé
AGS	Acide Gras Saturé
ALA	Acide Alpha-Linolénique
ANC	Apport Nutritionnel Conseillé
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation
Apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide Ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumin
Cav-1	Cavéoline 1
CCK	Cholécystokinine
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Cluster of Differentiation
CEL	Carboxyl Ester Lipase
Cer	Céramide
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
Chol	Cholestérol
CM	Chylomicron
CRNH	Centre de Recherche en Nutrition Humaine
CRP	C-Reactive Protein

D → H

dAUC	Decremental Area Under the Curve
DG	Diacylglycérol
DGAT	Diacylglycérol Acyltransferase
DHA	Acide docosahexaénoïque
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothreitol
E/H	Eau/Huile
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EPA	Acide eicosapentanoïque
ESI-MS/MS	Ionisation par Electronébuliseur couplée à la Spectrométrie de Masse
FABP_{pm}	Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein
FABP2	Fatty Acid Binding Protein 2
FATP4	Fatty Acid Transporter Protein 4
FRCM	Fraction Riche en Chylomicron
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
GC/MS	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GPAT	Glycérophosphate Acyltransférase
GPIHBP1	Glycosylphosphatidyl-Inositol anchored HDL Binding Protein 1
H/E	Huile dans Eau
HDL	High Density lipoprotein

I → N

IDL	Intermediate Density Lipoprotein
I-FABP	Intestinal Fatty Acid Binding Protein
IL	Interleukine
IMC	Indice De Masse Corporelle
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
J	Jour
LA	Acide Linoléique
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
L-FABP	Liver Fatty Acid Binding Protein
LP	Lipide(s) Polaire(s)
LPL	Lipoprotéine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide(s)
LRT	Lipoprotéine Riche en TG
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MD2	Myeloid Differentiation Protein 2
MFGM	Milk Fat Globule Membrane (Membrane des Globules Gras du Lait)
MG	Monoacylglycérol
MGAT	Monoacylglycérol Acyltransferase
MGLA	Matière Grasse Laitière Anhydre
MPL	Milk Polar Lipid
MRM	Multi Reaction Monitoring
MTTP	Microsomal Triglyceride Transfert Protein
MUC2	Mucine 2
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B

O → Z

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Phosphatidylcholine
PCTV	Prechylomicron Transport Vesicule
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PL	Polar Lipid
PLA2	Phospholipase A2
PS	Phosphatidylsérine
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RCH	Rectocolique Hémorragique
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcriptase
S	Semaine
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase 1
SGMS	Sphingomyéline synthase
SL	Sphingolipide
SM	Sphingomyéline
SPL	Soybean Polar Lipid
SR-BI	Scavenger Receptor class B member I
TA	Tissu Adipeux
TAmb	Température Ambiante
TBP	TATAbox Bindin Protein
TEER	Résistivité Trans-Epithéliale
TG	Triglycéride
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Liste des figures

Figure 1 : Lien entre syndrome métabolique et augmentation du risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires.....	19
Figure 2 : Structure d'un acide gras.....	26
Figure 3 : Les différentes familles d'acides gras : les différents degrés d'insaturation (A) et les configurations cis et trans (B).....	27
Figure 4 : Structure moléculaires des principales sources d'acides gras alimentaires	30
Figure 5 : Schéma des deux types d'émulsions liquide-liquide.....	31
Figure 6 : Globules gras du lait et structure de leur membrane	34
Figure 7 : Anatomie et histologie de l'intestin grêle humain.....	38
Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation du mucus dans l'intestin grêle et le côlon.	40
Figure 9 : Hydrolyse des lipides neutres et polaires dans l'intestin grêle.....	44
Figure 10 : La voie des 2-monoglycérides et la voie du glycérophosphate menant à la formation des TG et des phospholipides	49
Figure 11 : Métabolisme de la sphingomyéline par l'entérocyte..	50
Figure 12 : Captage et devenir intracellulaire des acides gras (A) et mécanisme détaillé de synthèse des chylomicrons (B)	51
Figure 13 : Structure générale d'une lipoprotéine.....	53
Figure 14 : Devenir métabolique des lipoprotéines.....	62
Figure 15 : Evolution du phénotype du tissu adipeux blanc	64
Figure 16 : Structure générale d'un lipopolysaccharide bactérien (A) et induction de l'inflammation par les LPS (B)	65
Figure 17 : Schéma de la relation entre les différents acteurs présentés dans ce manuscrit comme à l'origine de l'inflammation dans le tissu adipeux.....	68
Figure 18 : Schéma résumant la problématique et les études menées au cours de la thèse.....	79
Figure 19 : Plasma lipid concentrations and apoB48 levels in mice after oral administration of emulsions stabilized with MPLs or SPLs	93
Figure 20 : mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in small intestine of mice after oral administration of emulsions stabilized with MPLs or SPLs	95
Figure 21 : Lipid classes in the mice gut contents at 1 h and 2 h after oral administration of emulsions stabilized with MPLs or SPLs	96
Figure 22 : Kinetics of TG hydrolysis in the MPL or SPL emulsion in an in vitro static digestion system	97
Figure 23 : Schéma du protocole de l'étude <i>in vitro</i> des effets de la sphingomyéline sur le métabolisme lipidique des cellules intestinales.....	111

Figure 24 : Effets de l'ajout de 0,4 mM de sphingomyéline dans des micelles mixtes lipidique sur le diamètre des micelles (A), la sécrétion de TG (B) et le diamètre des chylomicrons sécrétés (C) par les cellules Caco-2/TC7 dans le milieu basal 24 heures après l'incubation	116
Figure 25 : Immunomarquage de l'apoB48 couplé à des billes d'or et observation au MET des milieux basolatéraux	118
Figure 26 : Expression génique des protéines du métabolisme lipidique après incubation de micelles mixtes lipidiques avec ou sans 0,4 mM de sphingomyéline.....	120
Figure 27 : Expression génique des protéines impliquées dans le métabolisme de la sphingomyéline	121
Figure 28 : Profil en principales espèces moléculaires de sphingomyéline dans les micelles mixtes incubées contenant 0,4mM de sphingomyéline et dans le milieu basolatéral après 24 heures d'incubation avec ces micelles	122
Figure 29 : Schéma bilan des effets de l'incubation de micelles mixtes enrichies ou non en sphingomyéline sur l'absorption lipidique et la synthèse de chylomicrons par les cellules Caco-2/TC7	123
Figure 30 : Schéma du déroulement de l'ensemble de l'étude clinique pour un volontaire	125
Figure 31 : Schéma d'une iléostomie (A) et poche de recueil (B)	127
Figure 32 : Déroulement d'une journée d'exploration de l'étude VALOBAB Digestion	131
Figure 33 : Caractérisation de la fraction riche en chylomicron (FRCM) en phase postprandiale suite à l'ingestion d'un petit déjeuner enrichi en différents teneurs de lipides polaires laitiers.....	134
Figure 34 : Schéma de la relation théorique entre la taille des chylomicrons et leur concentration en sphingomyéline	136
Figure 35 : Frequency distribution of adipocyte size in the epididymal (A) and retroperitoneal (B) WAT of mice	155
Figure 36 : Gene expression of inflammation markers in the epididymal WAT of mice	156
Figure 37 : Gene expression of lipid metabolism-related proteins in the small intestine of mice	157
Figure 38 : Characterization of duodenal and colonic goblet cells number, fecal loss of very-long chain fatty acids in mice and impact of the mucus layer thickness on ¹³ C oleic acid absorption by intestinal cells in vitro.	158
Figure 39 : Schéma récapitulant les principaux résultats des travaux réalisés.....	180

Liste des tableaux

Table 1 : Composition relative en classe de lipides polaires dans différentes sources commerciales de lécithines	33
Table 2 : Concentrations en lipides polaires du lait de vache et de différents produits laitiers (en % des lipides polaires totaux).	35
Table 3 : Caractéristiques des principales lipoprotéines humaines.....	54
Table 4 : Etude des effets des lipides polaires laitiers sur la lipémie postprandiale chez l'animal et l'Homme	59
Table 5 : Récapitulatif des études réalisées sur rongeur étudiant les effets de lipides polaires laitiers dans un régime sur le métabolisme lipidique	71
Table 6 : Récapitulatif des études cliniques étudiant les effets de la consommation de lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique	73
Table 7 : Hydrodynamic diameter of chylomicrons after the gavage of mice with MPL or SPL emulsion	94
Table 8 : Sphingolipid content in plasma chylomicrons 1 h after the gavage of mice with MPL or SPL emulsion	94
Table 9 : Composition of the experimental diets.....	152
Table 10 : Fatty acid profiles and polar lipid composition of the experimental diets	153
Table 11 : Values of the morphological and metabolic parameters	155

Table des matières

Résumé	4
Abstract	7
Publications, communications, bourses, prix et encadrement	8
Abréviation	10
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Introduction	19
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	24
1 Les lipides : composition, structure et organisation dans les aliments	25
1.1 Définition et fonctions dans l'organisme	25
1.2 Les acides gras	26
1.3 Structures moléculaires dans les aliments	28
1.4 Organisation dans les aliments : les émulsions lipidiques	31
1.5 Utilisation des lipides polaires comme ingrédient techno-fonctionnel et émergence des lipides polaires laitiers	32
1.5.1 Lipides polaires dans les aliments	32
1.5.2 La Membrane des globules gras du lait et les lipides polaires laitiers	33
2 Digestion et absorption des lipides alimentaires par l'organisme	36
2.1 L'intestin : un organe complexe adapté à l'absorption des nutriments	36
2.1.1 Anatomie générale	36
2.1.2 L'épithélium intestinal	37
2.1.3 Le microbiote intestinal	39
2.1.4 Le gel de mucus	40
2.2 Digestion des lipides	41
2.2.1 Hydrolyse	41
2.2.1.1 Hydrolyse buccale et gastrique	41
2.2.1.2 Hydrolyse Duodénale	42
2.2.2 Micellisation des produits d'hydrolyse.	43
2.3 Absorption intestinale	43
2.3.1 Libération des AGLC des micelles : rôle de la couche d'eau non agitée.	43
2.3.2 Captage des AGLC par les cellules.	45
2.3.2.1 Diffusion passive	45
2.3.2.2 Transport actif par des protéines membranaires	45
2.4 Le transport cytosolique des AGL	47
2.5 Assemblage et sécrétion des chylomicrons	48
2.5.1 Resynthèse intracellulaire des TG et LP	48
2.5.2 Synthèse et stockage de gouttelettes lipidique dans l'entérocyte	50
2.5.3 Synthèse des chylomicrons	52

2.5.4	Composition et structure des chylomicrons	53
2.5.5	Lipides non absorbés au niveau du côlon : une faible quantité mais un fort impact ?	55
2.6	Impact des lipides polaires alimentaires sur la digestion, l'absorption des lipides et la lipémie postprandiale	56
2.6.1	Digestion	56
2.6.2	Absorption et lipémie postprandiale	57
2.6.2.1	Impact différentiel des lipides polaires de soja et des protéines	57
2.6.2.2	Impact des lipides polaires laitiers	57
3	Devenir métabolique des lipides et conséquences inflammatoires	60
3.1	Devenir des chylomicrons	60
3.2	Inflammation du tissu adipeux	63
3.2.1	Impact des lipides alimentaires sur l'inflammation du tissu adipeux	64
3.2.2	Passage d'endotoxines bactériennes via une altération de la barrière intestinale et inflammation	65
3.2.2.1	Endotoxines et inflammation	65
3.2.2.2	Altération de la barrière intestinale : rôle du gel de mucus	67
3.2.2.3	Impact des lipides alimentaires sur les cellules à mucus	67
3.3	Effets connus des lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique, l'inflammation et la barrière intestinale	68
3.3.1	Impact des lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique	68
3.3.1.1	Etudes animales	68
3.3.1.2	Etudes cliniques	72
3.3.2	Impact des lipides polaires laitiers sur l'inflammation	74
3.3.3	Impact des LP laitiers sur la barrière intestinale	75
	HYPOTHESES ET OBJECTIFS	77
	CHAPITRE 1. Impact des lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique postprandial chez la souris : implication de la sphingomyéline <i>in vitro</i> et exploration modèle chez l'homme.	81
	Résumé du chapitre 1	83
1	Article	85
1.1	Introduction	87
1.2	Methods	88
1.2.1	Materials and emulsion preparation	88
1.2.2	Animals	89
1.2.3	Plasma lipid measurements	90
1.2.4	Quantification of apolipoprotein B48 in plasma	90
1.2.5	Chylomicron collection and analysis	90
1.2.6	Gene expression in the small intestine	90
1.2.7	<i>In vitro</i> emulsion hydrolysis.	91
1.2.8	Lipid analysis in lipolysis media and intestinal contents	91
1.2.9	Statistical analysis	91
1.3	Results	92
1.3.1	Lipid composition of the two emulsions	92
1.3.2	Postprandial lipemia during emulsion digestion in mice	92

1.3.3	Gene expression of lipid metabolism-related proteins in the small intestine.	94
1.3.4	Lipid composition of the small intestinal contents	95
1.3.5	Kinetics of emulsion TG hydrolysis in vitro.	96
1.4	Discussion	97
	References	107
2	Effet de la sphingomyéline sur le métabolisme lipidique des cellules Caco-2/TC7	111
2.1	Objectifs	111
2.2	Matériel et méthodes	112
2.2.1	Culture cellulaire	112
2.2.2	Incubation des Caco-2/TC7 avec des micelles mixtes lipidiques enrichies ou non en SM	112
2.2.2.1	Préparation des micelles lipidiques	112
2.2.3	Mesure de la résistivité trans-épithéliale TEER	113
2.2.4	Dosage des triglycérides dans le milieu basolatéral	113
2.2.5	Immunomarquage de l'apoB48 et couplage par bille d'or pour la microscopie électronique en transmission.	113
2.2.6	Mesure du diamètre hydrodynamique des micelles mixtes et des chylomicrons par granulométrie laser.	114
2.2.7	Composition en espèces de sphingomyéline et céramide des micelles et du milieu basal	115
2.2.8	Mesure de l'expression génique par RT-qPCR	115
2.3	Résultats et discussion	116
2.3.1	Effets de l'ajout de sphingomyéline sur la sécrétion des triglycérides par les cellules Caco-2	116
2.3.2	Effet de l'ajout de sphingomyéline sur l'expression génique des protéines impliquées dans l'absorption lipidique et la formation des chylomicrons.	119
2.3.3	Effet de l'ajout de sphingomyéline sur la sécrétion de sphingomyéline et son métabolisme.	120
3	Etude clinique VALOBAB Digestion	124
3.1	Objectifs	124
3.2	Matériel et méthodes	125
3.2.1	Plan d'étude	125
3.3	Sujets	126
3.3.1	Choix des personnes iléostomisées et recrutement	126
3.3.2	Critère d'inclusion/d'exclusion	127
3.4	Repas tests	128
3.5	Journée d'exploration métabolique	130
3.6	Analyses	131
3.6.1	Mesures anthropométriques	131
3.6.2	Séparation des lipoprotéines	131
3.6.3	Dosage des triglycérides et du cholestérol et analyse granulométrique dans les fractions riches en chylomicrons	132
3.7	Résultats préliminaires : concentration en triglycérides et cholestérol et diamètre de la fraction riche en chylomicrons.	132
3.8	Autres analyses prévues.	133
4	Discussion	135

CHAPITRE 2 : les lipides polaires du lait et du soja impactent différemment l'adiposité et l'inflammation, en association avec une modulation des cellules à gobelet du colon, dans un régime hyper-lipidique chez la souris.	141
Résumé du chapitre 2	143
1 Introduction	147
2 Materials and methods	148
2.1 Materials and preparation of lipid mixture for the diets	148
2.2 Animals and diets	148
2.3 Determination of fatty acid and phospholipid profile of the diets	149
2.4 Measurement of plasma lipids and LBP	149
2.5 Measurement of liver lipids and fecal fatty acid profile	149
2.6 Real-time PCR assays	150
2.7 Measurement of adipocyte size and number	150
2.8 Immunohistochemistry and quantitative analysis of intestinal goblet cells	150
2.9 Caco-2 cell culture and treatment	150
2.10 Statistical analysis	151
3 Results	151
3.1 PL composition of the experimental diets	151
3.2 SPLs increase adiposity and liver lipids unlike MPLs	153
3.3 SPLs induce adipocyte hypertrophy and adipose tissue inflammation unlike MPLs	154
3.4 MPLs decrease duodenal mucus cells and enhance gene expressions related to lipid absorption	156
3.5 MPLs increase colonic goblet cell number and fecal loss of fatty acids specific of SM	158
4 Discussion	159
Références	162
BILAN ET PERSPECTIVES	171
REFERENCES	181
Annexe 1	204
Annexe 2	206

Introduction : maladies métaboliques et stratégie de prévention nutritionnelle par les lipides polaires laitiers.

La pandémie d'obésité et son association avec la forte incidence du diabète de type 2 ont attiré l'attention sur un ensemble de troubles physiologiques associés au dysfonctionnement du métabolisme des lipides. Cet ensemble de troubles, connu sous le nom de syndrome métabolique, a été décrit pour la première fois par Jean Vague en 1947 (Vague, 1947) et défini par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 1998 (Alberti et al., 1998). En 2001, le NCEP/ATP III a proposé une nouvelle définition (révisée en 2005) ; facilement applicable en pratique clinique, elle est très largement utilisée. Selon celle-ci une personne possédant 3 des 5 critères suivants est atteinte d'un syndrome métabolique (Huang, 2009) :

- un tour de taille élevé (≥ 102 cm chez les hommes et ≥ 88 cm chez les femmes),
- une concentration plasmatique élevée en triglycérides (TG) ($> 1,5$ g/L ou traitement),
- basse en cholestérol-HDL ($< 0,40$ g/L chez les hommes et $0,50$ g/L chez les femmes),
- des pressions artérielles (PA) élevées (PAS > 130 mm Hg et/ou PAD > 85 mm Hg) et
- une glycémie à jeun élevée ($\geq 1,1$ g/L).

Glycémie élevée, dyslipidémie, obésité et hypertension sont des causes du développement de l'insulinorésistance et de l'athérosclérose qui sont impliquées respectivement dans l'apparition du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (Figure 1).

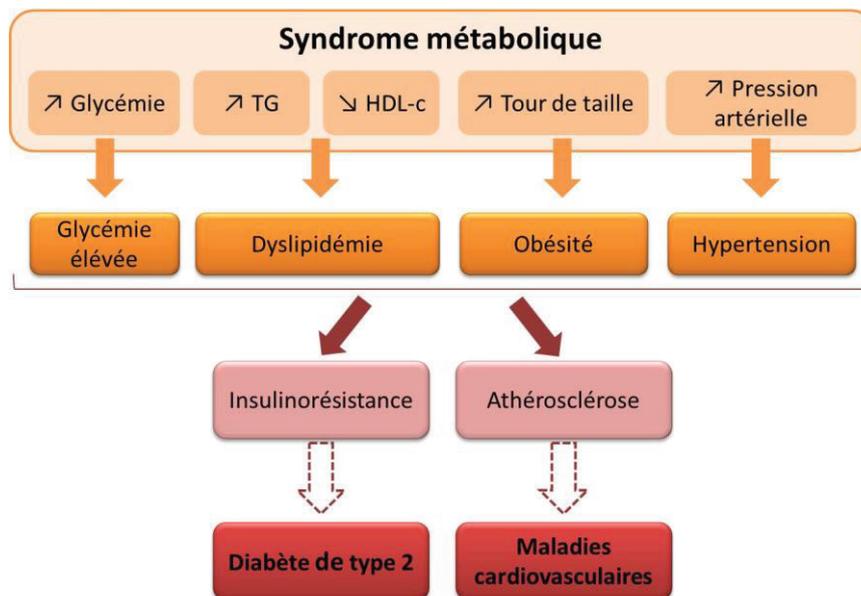


Figure 1 : Lien entre syndrome métabolique et augmentation du risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires.

Importance de la lipémie postprandiale.

Parmi les critères définissant un syndrome métabolique la dyslipidémie, et notamment une concentration plasmatique élevée en TG, jouerait un rôle majeur. En pratique clinique, la concentration plasmatique en TG ou triglycéridémie est mesurée à jeun. Cependant cette mesure à jeun ne reflète pas les variations de triglycéridémie qui ont lieu au cours de la journée suite à la consommation des différents repas. On qualifie d'état postprandial, l'état dans lequel se trouve l'organisme lors de la digestion des aliments, sa durée étant de l'ordre de 4 à 5 heures. La consommation de trois repas par jour conduit à rester presque constamment dans cet état postprandial. L'étude du métabolisme postprandial s'est donc beaucoup développée ces dernières années et l'hyperlipémie (taux élevé de lipides dans le sang) postprandiale est désormais reconnue comme un facteur de risque indépendant des maladies métaboliques et cardiovasculaires (Boren et al., 2014; Klop et al., 2013; Nordestgaard et al., 2007; Zilversmit, 1995). Une hyperlipémie postprandiale prolongée a été observée chez des personnes obèses, atteintes d'un syndrome métabolique voire de diabète de type 2, ou présentant une hyperlipémie à jeun (Lopez-Miranda et al., 2007). En phase postprandiale, les lipoprotéines riches en TG (LRT : chylomicrons et VLDL) qui sont sécrétés par l'intestin et le foie, et leurs résidus, sont en compétition accrue pour leur hydrolyse par les lipases et leur épuration. Une accumulation de ces lipoprotéines enrichies en cholestérol peut être cytotoxique pour les cellules. Elles peuvent notamment pénétrer la paroi des artères et contribuer au développement de la plaque d'athérome. La lipémie postprandiale est directement dépendante des niveaux de synthèse et de clairance des LRT mais aussi des caractéristiques de ces particules (taille et/ou contenu en TG) (Laville et al., 2013).

La lipémie postprandiale peut être modulée par de nombreux facteurs nutritionnels ou physiopathologiques. Parmi les facteurs nutritionnels, les lipides alimentaires jouent un rôle majeur. La quantité de lipides ingérés, leur qualité (profil en acides gras) mais aussi leur structure et leur organisation dans les aliments sont autant de paramètres susceptibles de moduler l'intensité et la durée de la lipémie postprandiale. Des quantités faibles (5-15 g) de lipides n'ont pratiquement pas d'effet sur la lipémie postprandiale (Dubois et al., 1998; Murphy et al., 1995). La triglycéridémie est significativement augmentée à partir d'un repas contenant entre 30 et 50 g de lipides ; on observe alors une relation dose-effet linéaire (Cohen et al., 1988; Dubois et al., 1998). De nombreuses études ont montré un effet de la qualité des acides gras ingérés sur la lipémie postprandiale. On peut retenir que les acides gras saturés semblent plutôt augmenter la lipémie postprandiale tandis que les acides gras polyinsaturés *n-3* la diminueraient (Jackson et al., 2005). Les acides mono-insaturés et polyinsaturés de la série *n-6* induiraient un effet intermédiaire (Mekki et al., 2002; Roche et al., 1998; Williams, 1998). Les acides gras à chaînes courtes et moyennes, qui sont directement absorbés par

simple diffusion passive et ne participent à la synthèse des chylomicrons, impactent peu la lipémie postprandiale (Lairon, 2008).

Récemment nos travaux et ceux d'autres équipes ont montré que la lipémie postprandiale peut être également modulée par la structure émulsionnée de la matière grasse (Keogh et al., 2011; M. C. Michalski et al., 2013; Vors et al., 2012; Vors et al., 2013). Nous avons montré chez l'Homme que la prise de matière grasse émulsionnée aboutit à un pic de TG des chylomicrons plus précoce et plus élevé en comparaison avec de la matière grasse non émulsionnée, reflétant une absorption facilitée des lipides (Vors et al., 2013). *In vitro* un effet du type d'émulsifiant (protéines vs lécithine de soja) utilisé pour stabiliser une émulsion sur l'absorption lipidique a été observé (Vors et al., 2012).

Importance de l'inflammation du tissu adipeux et de la barrière intestinale.

Un autre critère important du syndrome métabolique est l'augmentation de l'adiposité. Chez les obèses, la prise de masse grasse correspond à une hyperplasie et à une hypertrophie des adipocytes. Plus récemment, il a été montré que cette expansion du tissu adipeux (TA) était associée à une inflammation chronique de faible intensité dite à bas bruit caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires dans le TA et par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma.

Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme étant uniquement un lieu de stockage des graisses, un réservoir d'énergie. On sait désormais qu'il est aussi un organe endocrine capable de communiquer avec d'autres organes au travers de la sécrétion d'acides gras libres et de molécules actives appelée adipokines. L'expansion du tissu adipeux est associée à l'altération des concentrations plasmatiques de ces adipokines et à la production plus importante de cytokines pro-inflammatoires contribuant à la perturbation du signal de l'insuline et au dysfonctionnement endothélial (Greenberg et al., 2006; Ouchi et al., 2011). Cette inflammation chronique serait l'un des mécanismes par lequel le syndrome métabolique conduirait au développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires.

De nombreuses études montrent un rôle de l'intestin dans le développement de l'obésité et de ses complications. En effet, les lipides alimentaires sont rendus accessibles à l'organisme en premier lieu grâce à leur passage au travers de la barrière intestinale. L'intestin, avec l'aide d'autres acteurs, permet de digérer, d'absorber puis de sécréter dans la lymphe, les lipides alimentaires incorporés dans les LRT d'où ils rejoindront les différents organes. L'intestin grêle est capable d'adapter sa capacité d'absorption aux lipides ingérés. En effet des études chez la souris montrent une modulation de l'expression génique des protéines impliquées dans l'absorption des lipides et la

formation des chylomicrons selon la quantité et la qualité des lipides ingérés au cours d'un régime (Benoit et al., 2014; Hamilton et al., 2015; Petit, Arnould, et al., 2007). Les conséquences de ces différences d'absorption sur l'adiposité (hypertrophie et hyperplasie du TA) restent peu connues.

De plus, plusieurs études montrent qu'un régime hyper-lipidique peut également altérer la barrière intestinale via notamment des modulations de la perméabilité intestinale et de la composition du microbiote et ainsi contribuer au développement de l'obésité et de l'inflammation (Cani et al., 2008; Hamilton et al., 2015; Moreira et al., 2012). Les cellules à gobelet, responsables de la production de mucus dans l'intestin sont un composant majeur de cette barrière. En effet, le mucus qu'elles produisent constituerait la première barrière contre le passage de bactéries du microbiote et serait impliqué dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire (Chang et al., 2012; liboshi et al., 1996). Dans le côlon, le nombre de cellules à gobelet peut être régulé par la quantité et la qualité de lipides spécifiques non absorbés à ce niveau (Benoit et al., 2015).

Stratégie de prévention nutritionnelle : les lipides polaires laitiers, une nouvelle piste ?

L'ensemble de ces résultats montre que le syndrome métabolique est étroitement lié à la nutrition et notamment aux lipides alimentaires. Les lipides alimentaires sont constitués en majorité de TG dont les effets de la composition en acides gras sont largement étudiés. D'autres lipides présents en plus faible quantité sont les lipides polaires (LP). Ceux-ci sont des agents de formulation alimentaires importants, largement utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés émulsifiantes et leur contribution à la texture plaisante des aliments. Les lécithines de soja et d'œuf sont actuellement les sources commerciales majeures de LP et sont composées quasi exclusivement de glycérophospholipides. Cependant une nouvelle source émerge, les LP laitiers, qui présentent un profil spécifique avec plus de 70 % de glycérophospholipides mais aussi une large proportion de sphingolipides, notamment de sphingomyélines (SM, 25 à 30%). Ce profil lipidique spécifique s'explique par le fait que les LP laitiers sont présents dans le lait sous la forme d'une structure naturelle unique appelée la "membrane du globule gras du lait" ou "milk fat globule membrane" (MFGM) qui comme la majorité des membranes des cellules animales contient de la SM.

Selon la littérature récente, les LP laitiers pourraient contribuer à prévenir certaines altérations du métabolisme des lipides dans des situations d'excès alimentaires. Incorporés dans un régime hyper-lipidique ils permettraient de diminuer l'absorption de cholestérol et les taux de lipides hépatiques (Kamili et al., 2010; Wat et al., 2009; A. L. Zhou et al., 2012). De plus la consommation de babeurre, un produit riche en LP laitier, induirait des effets hypotenseurs et hypocholestérolémiant (Conway,

Couture, et al., 2014; Conway et al., 2013). Cependant si la plupart des études portent sur l'impact des LP laitiers sur le métabolisme lipidique à jeun, leurs effets sur la lipémie postprandiale restent peu connus en dépit de son importance comme facteur de risque cardiovasculaire. De plus, les mécanismes qui relient les spécificités structurales des LP laitiers à leur digestion et à leurs effets métaboliques restent à élucider. Enfin les effets à long terme de la consommation de LP laitiers sont peu connus notamment sur la structure et la fonction du tissu adipeux et de la barrière intestinale.

Avant de présenter les objectifs de mon travail et les résultats obtenus, une revue bibliographique introduit (i) la composition, la structure et l'organisation des lipides dans les aliments, (ii) les mécanismes par lesquels ils sont digérés, absorbés par l'intestin, puis sécrétés sous la forme de chylomicrons dans la circulation sanguine et (iii) leur devenir dans l'organisme et les conséquences inflammatoires pouvant être associées. L'impact des LP, notamment laitiers, sur l'ensemble de ces phénomènes est discuté. La dernière partie du manuscrit présente une discussion générale de l'ensemble des résultats ainsi que les perspectives de ce travail.

Synthèse Bibliographique

1 Les lipides : composition, structure et organisation dans les aliments

1.1 Définition et fonctions dans l'organisme

Avec les glucides et les protéines, les lipides sont l'une des trois grandes familles de macronutriments constitutives des aliments qui contribuent à l'apport énergétique nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont définis comme étant les acides gras (AG), leurs dérivés et les substances qui leur sont apparentées du point de vue de leur biosynthèse ou de leur fonctionnalité (Christie, 2013). Ils forment une famille hétérogène de molécules organiques qui se définissent par une propriété physique commune, leur solubilité. En effet, ces composés sont insolubles ou partiellement solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires. Leur état liquide ou solide à température ambiante est à l'origine des différents termes d'huiles ou de graisses.

Les lipides sont indispensables au fonctionnement de l'organisme où ils jouent plusieurs rôles :

- Un rôle de stockage de l'énergie : ils constituent des réserves intracellulaires d'énergie sous la forme de TG essentiellement dans le tissu adipeux.
- Un rôle structural : ils entrent dans la composition des membranes des cellules sous la forme de phospholipides et constituent une couche de protection thermique de cellules ou d'organes.
- Un rôle de messenger/d'activité biologique : ils constituent ou sont des précurseurs de molécules permettant la signalisation extra- et intracellulaire, la régulation hormonale, etc.
- Enfin, ils permettent le transport des vitamines liposolubles (A, D, E et K).

Selon les recommandations nutritionnelles établies par l'ANSES en 2010, les lipides alimentaires devraient représenter 35 à 40 % de l'apport énergétique total quotidien, soit environ 20 % en masse de l'ensemble des macronutriments (protéines + glucides + lipides). La limite haute de cette fourchette est dépassée en France par environ 43 % des adultes et 34 % des enfants. A l'origine ces recommandations ont été conçues pour évaluer les carences en nutriments indispensables mais aujourd'hui, avec l'essor des connaissances scientifiques en nutrition, leur finalité va bien au-delà. Elles ont pour objectifs de définir des niveaux d'apports en vue d'optimiser les fonctions normales de l'organisme et à terme de réduire le risque d'apparition de maladies à composante nutritionnelle démontrée.

1.2 Les acides gras

Les AG, motif structural de base des lipides, sont des acides carboxyliques comportant une chaîne hydrocarbonée, partie hydrophobe, avec un groupement carboxyle (COOH), partie hydrophile, et un groupement méthyle (CH₃) (Figure 2).

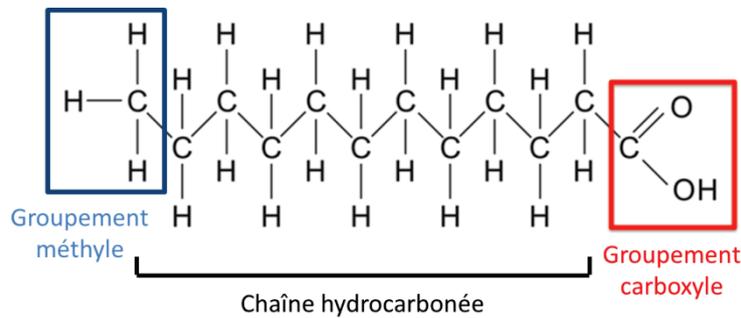


Figure 2 : Structure d'un acide gras. Exemple de l'acide laurique (12:0).

Les AG peuvent être classés selon :

- **la longueur de leur chaîne carbonée** : la grande majorité des AG naturels possèdent un nombre pair de carbones (C) allant de 4 à 24 C. Il est possible de trouver des AG à nombre impair de carbones (acides pentadécyclique 15:0 et margarique 17:0) dans la matière grasse laitière par exemple. Selon la longueur on parle d'AG à chaîne courte (entre 4 et 6 C), moyenne (entre 8 et 12 C), longue (entre 14 et 20 C) et d'AG à très longue chaîne (plus de 20 C). Les lipides alimentaires contiennent majoritairement des AG de 10 à 22 C.
- **Leur degré d'insaturation** qui va de 0 à 6 double liaisons sur la chaîne carbonée. Les AG n'ayant aucune double liaison sont dits saturés (AGS), ceux qui possèdent une double liaison sont dits monoinsaturés (AGMI) et les AG ayant un nombre de double liaisons supérieur ou égal à deux sont dits polyinsaturés (AGPI). La position de la première double liaison en partant de l'extrémité ω de l'AG permet de catégoriser les AGPI en 3 familles : les AG des séries $n-9$ (oméga 9 ou ω_9), séries $n-6$ (oméga 6 ou ω_6) et des séries $n-3$ (oméga 3 ou ω_3) (Figure 3). Enfin les doubles liaisons peuvent présenter deux types d'isomérisation : *cis* lorsque les chaînes carbonées sont du même côté de la double liaison, la plus courante dans notre organisme et les aliments, et *trans* lorsque les chaînes carbonées sont de part et d'autre de la double liaison (Figure 3).

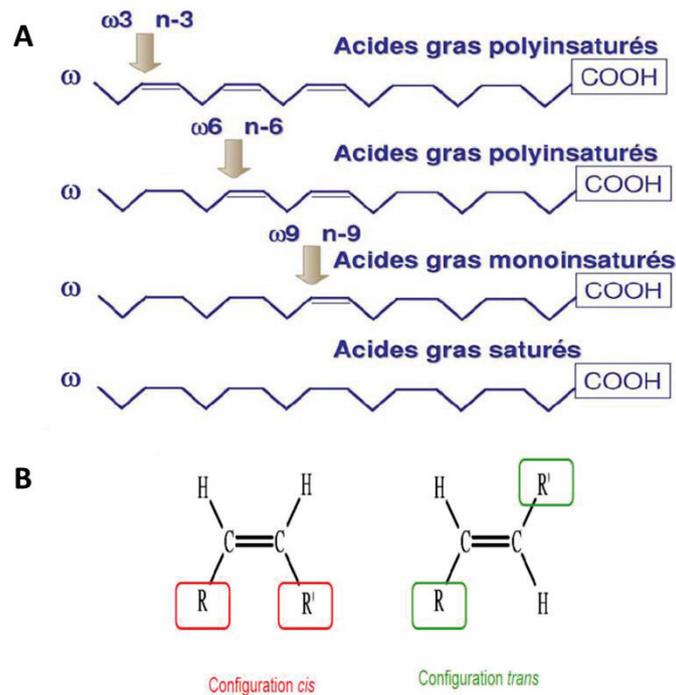


Figure 3 : Les différentes familles d'acides gras : les différents degrés d'insaturation (A) et les configurations cis et trans (B). Source : (Benoit, 2013)

- Enfin, d'un point de vue **physiologique**, on distingue :
 - ❖ les AG indispensables qui sont nécessaires au développement et au fonctionnement de l'organisme mais qu'il ne sait pas fabriquer. Il s'agit de l'acide linoléique (LA, 18:2(n-6)) et l'acide alpha-linolénique (ALA, 18:3(n-3)). L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6(n-3)) est un dérivé de l'ALA cependant il ne peut pas être produit en quantité suffisante pour répondre aux besoins de l'organisme et il est donc considéré comme un AG indispensable.
 - ❖ les AG conditionnellement indispensables qui sont également essentiels pour la croissance normale et les fonctions physiologiques des cellules mais qui eux peuvent être synthétisés par l'organisme à partir de leurs précurseurs les AG indispensables. Ils sont requis en cas d'absence des précurseurs dans l'alimentation. Il s'agit de l'acide arachidonique, dérivé majoritaire de LA, et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5 (n-3)), dérivé de l'ALA. Les AG indispensables et conditionnellement indispensables constituent les acides gras essentiels.
 - ❖ Les AG non indispensables ou non essentiels correspondent à l'ensemble des AG que l'organisme est capable de synthétiser.

1.3 Structures moléculaires dans les aliments

Les AG sous leur forme libre sont très peu présents dans les aliments. On les retrouve en très forte majorité sous leur forme estérifiée. En effet, les huiles ou matières grasses alimentaires sont constituées à 90-99% de triesters d'AG et de glycérol : les triacylglycerols ou triglycérides (TG). Il y a trois positions possibles pour les AG sur le glycérol: deux externes, *sn-1* et *sn-3*, et une interne, *sn-2* (Figure 4). Une huile est ainsi non seulement caractérisée par sa composition globale en AG mais également par sa composition en espèces moléculaires de TG. Chaque espèce moléculaire se caractérise par le type d'AG se trouvant sur ces différentes positions. Par exemple, dans l'huile de palme, l'acide palmitique (16:0) est majoritairement en positions externes tandis que dans le lait et le saindoux, il se trouve principalement en position interne (Raynal-Ljutovac et al., 2011). Les TG ont un caractère apolaire, c'est pourquoi on les dénomme, avec les monoglycérides (MG) et diglycérides (DG), les lipides neutres. En effet, les parties polaires (hydroxyde du glycérol) et ioniques (carboxyles des AG) disparaissent dans les liaisons esters ne laissant que les trois chaînes hydrocarbonées très hydrophobes. Les lipides neutres sont des lipides de dépôts et constituent des réserves énergétiques dans l'organisme.

La deuxième classe de structure moléculaire que l'on retrouve dans les aliments est constituée des lipides polaires (LP) : les phospholipides, les sphingolipides et les glycolipides. Ils sont dénommés ainsi par opposition aux lipides neutres, car ces molécules possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe leur donnant un caractère amphiphile (Figure 4). Les LP représentent 1 à 10 % des apports lipidiques (Cohn et al., 2008; Mu et al., 2004) mais d'un point de vue fonctionnel ce sont des ingrédients majeurs pour l'industrie agroalimentaire. En effet, de par leur caractère amphiphile ils empêchent l'eau et les graisses de se séparer. Ils ont ainsi un pouvoir émulsifiant et moussant et donnent de la texture aux aliments : ce sont des émulsifiants alimentaires.

Les phospholipides comprennent les glycérophospholipides et la sphingomyéline. Les glycérophospholipides sont constitués d'un glycérol estérifiés par deux AG en position *sn-1* et *sn-2*, et par un acide phosphorique en position *sn-3* lui-même estérifié par un groupement polaire qui donnera l'identité du phospholipide (Figure 4). Le groupement X peut être :

- chargé positivement, c'est le cas de la choline donnant la phosphatidylcholine (PC) et de l'éthanolamine donnant la phosphatidyléthanolamine (PE). Par ailleurs, le groupement phosphate étant chargé négativement, la charge globale de ces deux phospholipides est nulle.
- non chargé, c'est le cas de la sérine donnant la phosphatidylsérine (PS) et de l'inositol donnant le phosphatidylinositol (PI). La charge globale de ces phospholipides est donc négative.

Lorsqu'un seul AG est estérifié sur le glycérol (en position *sn-1*), il s'agit d'un lyso-phospholipide. Les phospholipides sont les principaux constituants des membranes biologiques du règne animal et végétal. Ils sont organisés en bicouche lipidique formant une barrière à la surface des cellules et un environnement propice pour les enzymes, les récepteurs et les protéines de transports.

Les sphingolipides dérivent eux de la sphingosine, une amine constituée d'une chaîne aliphatique mono-insaturée et deux fonctions alcool : l'une primaire et l'autre secondaire. La fixation sur la fonction amine d'un AG donne un céramide. La fonction alcool primaire peut-elle réagir avec différents composés :

- l'acide phosphorique qui lui-même estérifie la choline pour donner un phosphosphingolipide plus couramment appelé la sphingomyéline ; la sphingomyéline fait donc également partie des phospholipides
- un glucide pour former alors ce que l'on appelle un glycosphingolipide. S'il s'agit d'un glucide (D-glucose ou D-galactose), le composé formé est un cérébroside. S'il s'agit d'une structure osidique complexe avec au moins trois résidus osidiques dont l'un est estérifié à l'acide sialique, c'est une ganglioside.

Les sphingolipides sont présents dans les membranes des cellules des mammifères, notamment dans la gaine de myéline du tissu nerveux et dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. La sphingomyéline est également présente dans la membrane des globules gras du lait.

Enfin, les glycéroglycolipides sont constitués d'un glycérol estérifiés par deux AG en position *sn-1* et *sn-2*, et d'une chaîne glucidique en position *sn-3* par une liaison glycosidique. Les glycéroglycolipides et les glycosphingolipides forment le groupe des glycolipides.

Les stérols font également partie des lipides et proviennent soit de l'alimentation, soit d'une synthèse endogène. Le cholestérol et les phytostérols sont les stérols les plus retrouvés dans les aliments. Le cholestérol est exclusivement apporté par les produits animaux et les phytostérols sont présents en faibles quantités dans les végétaux. Le cholestérol et la sphingomyéline sont présents en concentrations élevées dans les radeaux lipidiques des membranes plasmiques qui sont des domaines très actifs et interviendraient notamment dans le contrôle de la transduction du signal (Pike, 2003).

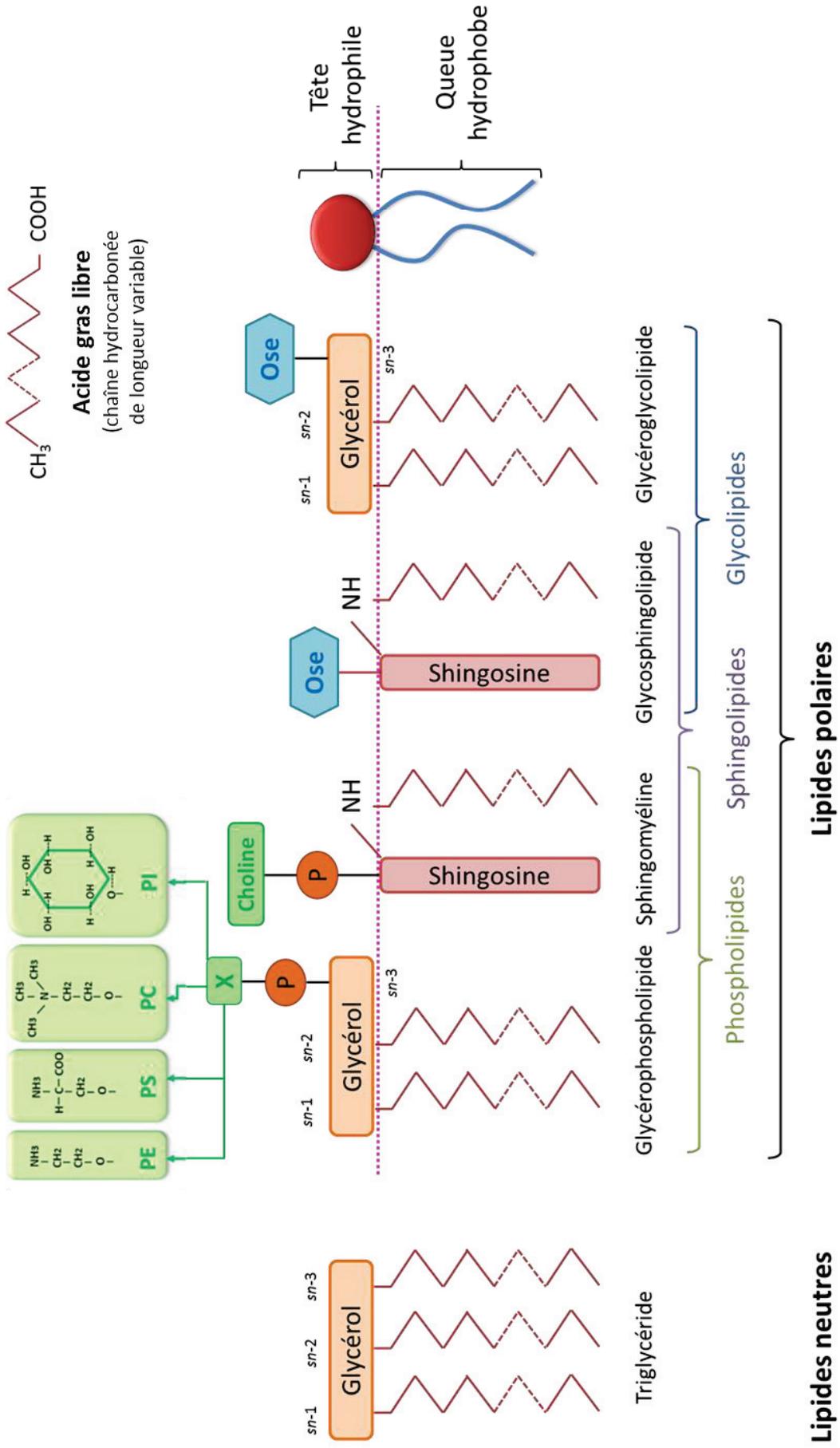


Figure 4 : Structure moléculaires des principales sources d'acides gras alimentaires. Source : adapté de (Castro-Gomez, Garcia-Serrano, Visioli, & Fontecha, 2015)

1.4 Organisation dans les aliments : les émulsions lipidiques

De plus à l'échelle microscopique dans les produits alimentaires n'ayant pas subi de transformation, ces structures moléculaires que sont les TG et les LP ont la capacité de s'agencer en différentes structures supramoléculaires comme par exemple les globules gras du lait. Enfin dans les aliments transformés, les lipides se réorganisent généralement en fonction des autres constituants présents et des traitements technologiques appliqués au cours de la préparation. A l'échelle macroscopique, ils peuvent alors se retrouver sous forme libre (huile, saindoux) ou dispersée dans une phase liquide on parle alors d'émulsion (vinaigrette, mayonnaise, margarine, lait, yaourt) ou sous forme d'inclusions lipidiques dans des matrices solides (biscuits, fromages).

Nous revenons ici plus en détails sur la forme émulsionnée qui est très utilisée en agroalimentaire pour incorporer dans une phase aqueuse des TG qui y sont insolubles. Une émulsion est une dispersion de deux liquides non miscibles sous la forme de gouttelettes. Dans une émulsion on trouve une phase dispersée (ou discontinue) et une phase dispersante (ou continue). Il existe deux types d'émulsions liquide-liquide (Figure 5) :

- huile-dans-eau (H/E) : la phase lipidique est dispersée dans la phase aqueuse (par exemple le lait et la mayonnaise)
- eau-dans-huile (E/H) : la phase aqueuse est dispersée dans la phase lipidique (par exemple le beurre et la margarine)

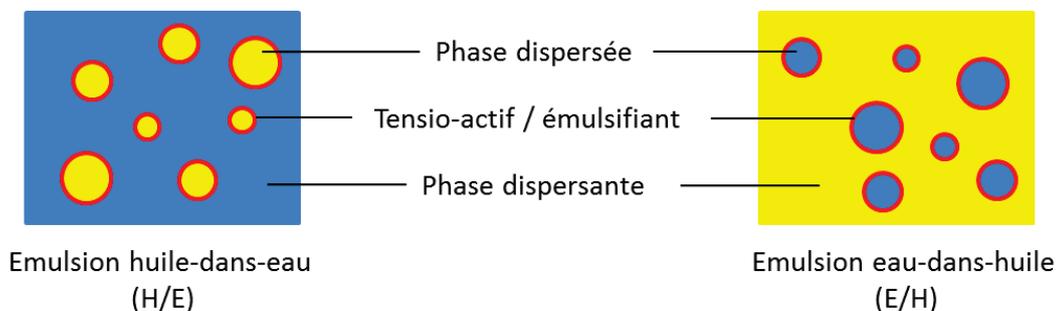


Figure 5 : Schéma des deux types d'émulsions liquide-liquide. Source : (Vors, 2012)

Pour stabiliser les deux phases de l'émulsion, l'ajout de molécules tensioactives est indispensable. En effet ces composés amphiphiles comportent à la fois des fonctions hydrophiles et hydrophobes ce qui leur permet de s'adsorber à l'interface des gouttelettes permettant ainsi de stabiliser l'émulsion en diminuant la tension interfaciale. En agroalimentaire, les molécules tensioactives sont appelées émulsifiants. Parmi les émulsifiants actuellement utilisés il faut distinguer les composés naturels des composés synthétiques. Ces derniers sont classés dans les additifs alimentaires et ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Les émulsifiants naturels peuvent être de nature protéique (protéines du

lactosérum, caséinates par exemple) et/ou de nature lipidique (LP, MG et DG). La taille des gouttelettes de phase dispersée dans les émulsions alimentaires peut varier du dixième de μm à plusieurs dizaines de μm .

Enfin les émulsions se retrouvent dans des aliments à l'état naturel comme le lait qui est une émulsion de type H/E. En effet, sa matière grasse se présente sous la forme de gouttelettes lipidiques appelées globules gras, dispersées dans une phase aqueuse et stabilisées à l'interface, grâce à une membrane biologique tricouche riche en LP laitiers (M. C. Michalski et al., 2006).

1.5 Utilisation des lipides polaires comme ingrédient techno-fonctionnel et émergence des lipides polaires laitiers

1.5.1 Lipides polaires dans les aliments

La consommation moyenne de LP n'est pas précisément connue mais on l'estime à 2-8 g par jour soit de 1 à 10 % des apports lipidiques (Cohn et al., 2010). Actuellement l'essor des produits allégés en matières grasses ferait diminuer ce chiffre. Les LP sont naturellement présents dans les produits d'origine animale (viande, œuf, lait), marine (poisson, crustacés, krill) et dans les céréales et les graines oléagineuses (Cohn et al., 2010). En revanche les légumes et les fruits en sont presque dépourvus (Weihrauch et al., 1983). Dans l'industrie agroalimentaire, les LP sont très largement utilisés comme émulsifiants. Ils sont présents en très faible quantité (moins de 0,5%) mais dans un grand nombre de produits manufacturés. En conséquence, la quantité de LP ingérée de cette façon n'est probablement pas négligeable. Certains LP sont également vendus comme compléments alimentaires.

Les principaux extraits de LP, couramment appelés **lécithines** en agro-alimentaire, connus sont :

- **La lécithine de soja** qui est la principale source commerciale de LP, avec environ 200 000 tonnes métriques vendues par an, représentant ainsi 90% du marché des LP. 4 % des lipides du soja sont des LP, parmi lesquels 55% sont de la PC, 26% de la PE et 18% de la PI (Castro-Gomez et al., 2015). Les LP de soja contiennent 22,4 % d'AGS et 75,5 % d'AG insaturés (AGI) et sont caractérisés par leur teneur importante en acide linoléique, AGPI de la série *n*-6 (58%) (Kullenberg et al., 2012) (Table 1).
- **La lécithine d'œuf** qui est utilisée de façon plus mineure, avec environ 300 tonnes métriques vendues par an. Le jaune d'œuf contient environ 10 % de LP, dont majoritairement de la PC (65-70%), puis par ordre décroissant de la PE (15-26%), SM (2,5-5%) et de la lysoPC (6-8%) (Castro-

Gomez et al., 2015). Ils contiennent 54 % d'AGI et 46 % d'AGS. L'acide oléique, qui est un AGMI, est le principal AGI retrouvé dans les LP d'œuf (Kullenberg et al., 2012) (Table 1).

- **Les LP marins.** Les produits marins, comme le krill, peuvent avoir jusqu'à 50 % de LP dans leur fraction lipidique. Principalement de la PC (87 %) puis de la PE (6 %), de la PI (2 %) et de la SM (3,5 %) (Castro-Gomez et al., 2015). Leur profil en AG est très majoritairement constitué d'AGI et notamment 18,8 % d'EPA et 22,8 % de DHA, AGPI de la série des *n*-3 (Kullenberg et al., 2012) (Table 1).
- **Les LP laitiers.** La fraction lipidique du lait et des produits laitiers a une assez faible teneur en LP (0,3 à 1%). En revanche le babeurre, co-produit de l'industrie laitière obtenu lors de la préparation du beurre à partir de la crème, est enrichi en membrane des globules gras du lait qui contient jusqu'à 40 % de LP ; différents types de babeurre peuvent ainsi contenir entre 1 et 9 g/L de LP. La structure et la composition de la MFGM font l'objet d'un paragraphe plus détaillé ci-dessous.

Table 1 : Composition relative en classe de lipides polaires dans différentes sources commerciales de lécithines. Source : Adapté de (Castro-Gomez et al., 2015) et (Kullenberg et al., 2012).

en %	LP de soja	LP d'œuf	LP marins	LP laitiers
PC	55	65-70	87	31
PE	26	15-26	6	30
PI	18	-	2	7
PS	-	-	-	5
SM	-	2,5-5	3,5	20

1.5.2 La Membrane des globules gras du lait et les lipides polaires laitiers

Comme expliqué précédemment (paragraphe 1.4), la matière grasse du lait se compose de 98 % de TG présents au cœur de gouttelettes lipidiques appelées les globules gras du lait. Ces globules sont formés dans les cellules épithéliales des glandes mammaires. D'abord sécrétés par le réticulum endoplasmique, les précurseurs des globules gras migrent dans le cytoplasme vers la membrane apicale. Lors de cette migration, les précurseurs coalescent pour former de plus gros globules et s'entourent d'une monocouche constituée essentiellement de LP et de protéines. Ils sont ensuite progressivement enveloppés par la membrane apicale des cellules et sécrétés dans le lumen alvéolaire emportant avec eux une partie de cette membrane biologique constituée d'une bicouche de LP et de protéines. Les globules gras du lait sont donc recouverts d'une membrane, appelée MFGM (pour milk fat globule membrane) qui présente une structure unique et complexe. En effet,

elle est constituée d'une triple couche de LP mais également de protéines, d'enzymes, de cholestérol, d'AG libre et de glycoprotéines (Figure 6) (El-Loly, 2011).

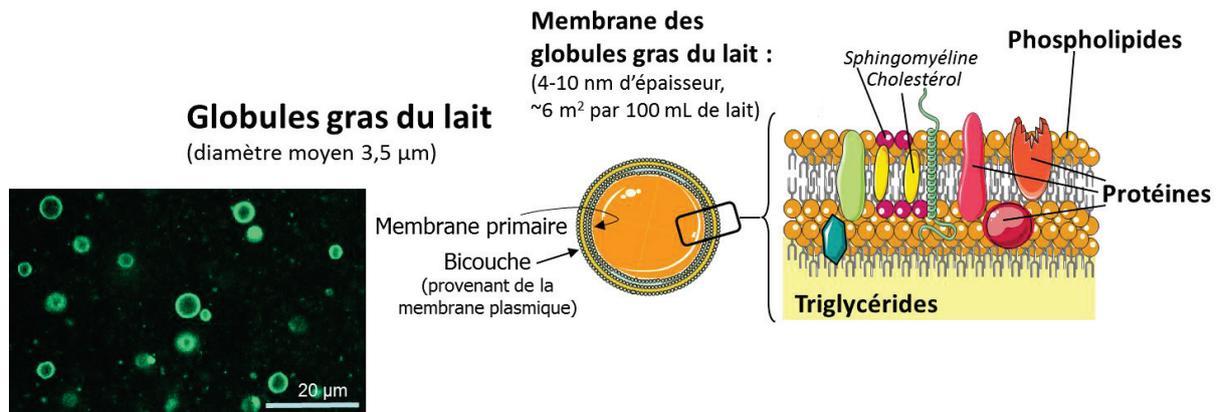


Figure 6 : Globules gras du lait et structure de leur membrane. Source : adapté d'une communication personnelle du Dr. Michalski.

Les lipides de la MFGM sont très majoritairement des LP avec principalement 31% de PC, 30% de PE, 20% de SM, 7% de PI et 5 % de PS (Castro-Gomez et al., 2015) (Table 1). Des lyso-PC et lyso-PE sont parfois aussi détectés mais il pourrait s'agir d'artefacts obtenus au cours des analyses ou de produits de lipolyse enzymatique (El-Loly, 2011; Rombaut et al., 2006). La composition en LP de la MFGM varie beaucoup dans la littérature notamment dû aux différentes techniques d'isolation, de purification et d'analyses mais également à la variabilité naturelle de la composition lipidique du lait. Des variations de composition en LP du lait en fonction de l'espèce de mammifère ont notamment été observées (cf. revue (Contarini et al., 2013)). De même, les différents produits laitiers (par exemple les crèmes, fromages, beurres, babeurres) présentent des teneurs et des profils en LP différents. En effet les traitements du lait nécessaire à leur fabrication peuvent entraîner une rupture de la MFGM et/ou une séparation des globules gras et/ou des lipides neutres et polaires conduisant aux différences observées (Table 2).

Les PE, PI et PS sont localisés principalement dans la monocouche interne tandis que la PC et la SM se trouvent dans la bicouche externe.

La MFGM contient également de nombreuses protéines. Les principales sont la butyrophiline, la xanthine oxydase, la glycoprotéine B, la mucine 1, CD36, PAS 6/7, l'adipophiline et FABP. Des propriétés bénéfiques pour la santé ont été observées pour certaines de ces protéines. La xanthine oxydase par exemple aurait des propriétés anti-inflammatoires (Fong et al., 2007; Spitsberg, 2005).

Table 2 : Concentrations en lipides polaires du lait de vache et de différents produits laitiers (en % des lipides polaires totaux). Adapté de (Castro-Gomez et al., 2015) et (Contarini et al., 2013).

Référence		PC	PE	PI	PS	SM
Lait de Vache		% LP totaux				
(Avalli et al., 2005)		27,3	32,3	9,3	10,5	20,5
(Rombaut et al., 2006)		27,4	33,2	5,2	9,3	25,1
(Rombaut et al., 2007)		21,1	46,4	5,3	7,4	19,8
(Fong et al., 2007)		33,2	32,6	7,6	5,3	21,3
(Fauquant et al., 2007)		32,1	36,4	7,6	6,5	17,3
(Lopez et al., 2008)		22,0	26,8	13,6	16,1	21,6
(Sanchez-Juanes et al., 2009)		32,7	28,5	14,1*		23,0
(Rodríguez-Alcalá et al., 2010)		25,9	38,5	6,5	7,7	21,4
(Gallier et al., 2010)		42,8	26,4	3,4	2,0	25,5
(Le et al., 2011)		27,0	36,9	6,1	6,3	23,7
(Garcia et al., 2012)		30,5	33,8	3,9	10,6	21,2
(Castro-Gómez et al., 2014)		29,3	42,0	3,9	3,4	21,0
Produits laitiers		% LP totaux				
(Avalli et al., 2005)	Crème	14,6	42,7	6,8	7,2	28,6
	Beurre	24,7	31	11,9	15,3	17,1
	Babeurre	35,5	33,5	2,4	10,3	18,3
(Costa et al., 2010)	Crème	33,7	17,7	15,4	11,3	21,8
	Beurre	33,3	17,7	15,8	11,5	21,8
	Babeurre	46,1	17	7,1	8,1	21,7
(MacKenzie et al., 2009)	Crème	26,5	26,7	7,5	11,7	20,8
(Gallier et al., 2010)	Babeurre	51,2	8,4	8,2	4,6	27,6

* somme de PI et PS

Dans cette première partie nous avons vu que les lipides alimentaires sont constitués d'AG s'assemblant dans les aliments principalement en molécules de TG et de LP. Ces molécules s'organisent en différentes structures supramoléculaires notamment en émulsions dans lesquelles des gouttelettes constituées d'un cœur hydrophobe de TG sont stabilisées à leur surface par des molécules amphiphiles appelées tensioactifs. Dans l'industrie agroalimentaire les LP sont utilisés pour jouer ce rôle de tensioactif et sont extraits principalement du soja et de l'œuf. Le lait est également une source de LP qui se trouvent dans une structure unique la MFGM. Les différentes sources alimentaires de LP produisent des extraits aux profils en classes de LP différents. Nous allons voir dans la partie suivante comment ces TG et LP sont digérés et absorbés par notre organisme. Nous verrons également quel est l'impact de la structure émulsionnée et surtout du type d'émulsifiant utilisé pour émulsionner sur ces phénomènes.

2 Digestion et absorption des lipides alimentaires par l'organisme

2.1 L'intestin : un organe complexe adapté à l'absorption des nutriments

L'appareil digestif humain est composé de plusieurs organes qui jouent chacun un rôle spécifique dans la digestion des aliments : la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin. Les lipides étant principalement digérés et absorbés dans l'intestin grêle nous nous attarderons ici sur son anatomie et sa physiologie ainsi que sur celle du gros intestin où réside la plus forte densité de bactéries du microbiote intestinal.

2.1.1 Anatomie générale

L'intestin grêle

L'intestin grêle relie l'estomac au gros intestin et mesure chez l'Homme en moyenne 6 m. Il est divisé en trois parties successives aux caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Immédiatement après l'estomac commence le duodénum premier segment court en forme de C qui enserre le pancréas. Le duodénum reçoit les sels biliaires via le canal cholédoque issu du foie et les enzymes pancréatiques via le canal de Wirsung issu du pancréas. Il est le lieu majeur de la digestion des lipides. Il est suivi du jéjunum qui correspond environ aux 2/5 de l'intestin grêle et représente le site préférentiel de l'absorption lipidique. Le jéjunum se poursuit par l'iléon, correspondant aux 3/5 distaux, qui est le site majeur de la réabsorption des sels biliaires.

La structure générale de la paroi de l'intestin grêle se compose de quatre couches concentriques qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur : (i) la séreuse, fine membrane soutenant les gros vaisseaux sanguins et les nerfs, (ii) la musculuse, couche musculaire permettant la propulsion et le pétrissage du bol alimentaire, (iii) la sous-muqueuse, couche mince de tissu conjonctif hébergeant les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les plexus nerveux sous-muqueux et enfin, (iv) la muqueuse, couche la plus superficielle composée de l'épithélium et de la lamina propria, qui est le siège de l'absorption des nutriments.

La structure spécifique de la muqueuse au niveau de l'intestin grêle lui permet d'obtenir une très grande amplification de sa surface en comparaison avec le reste du tube digestif et ainsi d'augmenter sa capacité d'absorption de façon très importante. Cette amplification de surface est obtenue grâce à de nombreux replis circulaires de la muqueuse appelés valvules conniventes. De plus sur ces valvules se trouve des évaginations d'environ 1mm de haut appelées villosités qui à nouveau permettent d'augmenter la surface de la muqueuse. Les villosités sont très grandes dans le duodénum puis leur taille diminue le long de l'intestin grêle. Entre les villosités s'enfoncent des invaginations appelées cryptes. Enfin les cellules entérocytaires de l'épithélium participent aussi à ce phénomène en

développant à leur surface des microvillosités qui forme ce que l'on appelle une bordure en brosse (Figure 7).

Le gros intestin

Le gros intestin reliant l'iléon à l'anus est composé de quatre parties successives : le cæcum, le côlon, le rectum et le canal anal. Le gros intestin a pour rôle de permettre l'absorption d'eau et d'électrolytes. Dans le côlon, les bactéries du microbiote intestinal se chargent de la digestion des fibres alimentaires, non-digérables par l'Homme, par des mécanismes de fermentation. Ainsi le contenu intestinal se durcit et sera éliminé sous la forme de selles semi-solides au niveau de l'anus contenant notamment les composés alimentaires non digérés, des cellules épithéliales desquamées, du mucus et des bactéries.

La structure de la paroi du gros intestin est similaire à celle de l'intestin grêle mais elle présente des particularités. En effet, la muqueuse colique ne présente pas de villosités mais uniquement des cryptes plus profondes que celles trouvées dans l'intestin grêle.

2.1.2 L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est formé d'une monocouche de différents types cellulaires dont les quatre principaux décrits sont les suivants : les entérocytes, les cellules à gobelet, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (Figure 7).

- **Les entérocytes** sont responsables de l'absorption des nutriments et micronutriments ingérés. Ces cellules se trouvent dans les villosités et représentent 90 % des cellules de l'épithélium. Dans le côlon, les colonocytes absorbent les produits de fermentation des bactéries du microbiote. Entérocytes et colonocytes sont fortement polarisés avec au pôle apical uniquement des microvillosités permettant d'augmenter la surface de contact. De plus, les microvillosités forment avec le glycolix et le gel de mucus la couche d'eau non agitée nécessaire au captage des AG.
- **Les cellules à gobelet** également appelées cellules à mucus ou caliciformes produisent le gel de mucus qui a notamment pour rôle de lubrifier le contenu intestinal et protéger l'épithélium contre les enzymes intraluminales (voir paragraphe 2.1.4). Présentes dans tout le tractus au niveau des cryptes et des villosités, leur proportion augmente graduellement du duodénum (10%) jusqu'au côlon (25%) (Karam, 1999).
- **Les cellules entéroendocrines** (1% de l'épithélium), produisent et sécrètent différents peptides qui impactent la digestion et le métabolisme énergétique. Ces peptides sont stockés dans des granules et libérés par exocytose au pôle basal de la cellule en réponse à des signaux captés au pôle apical.

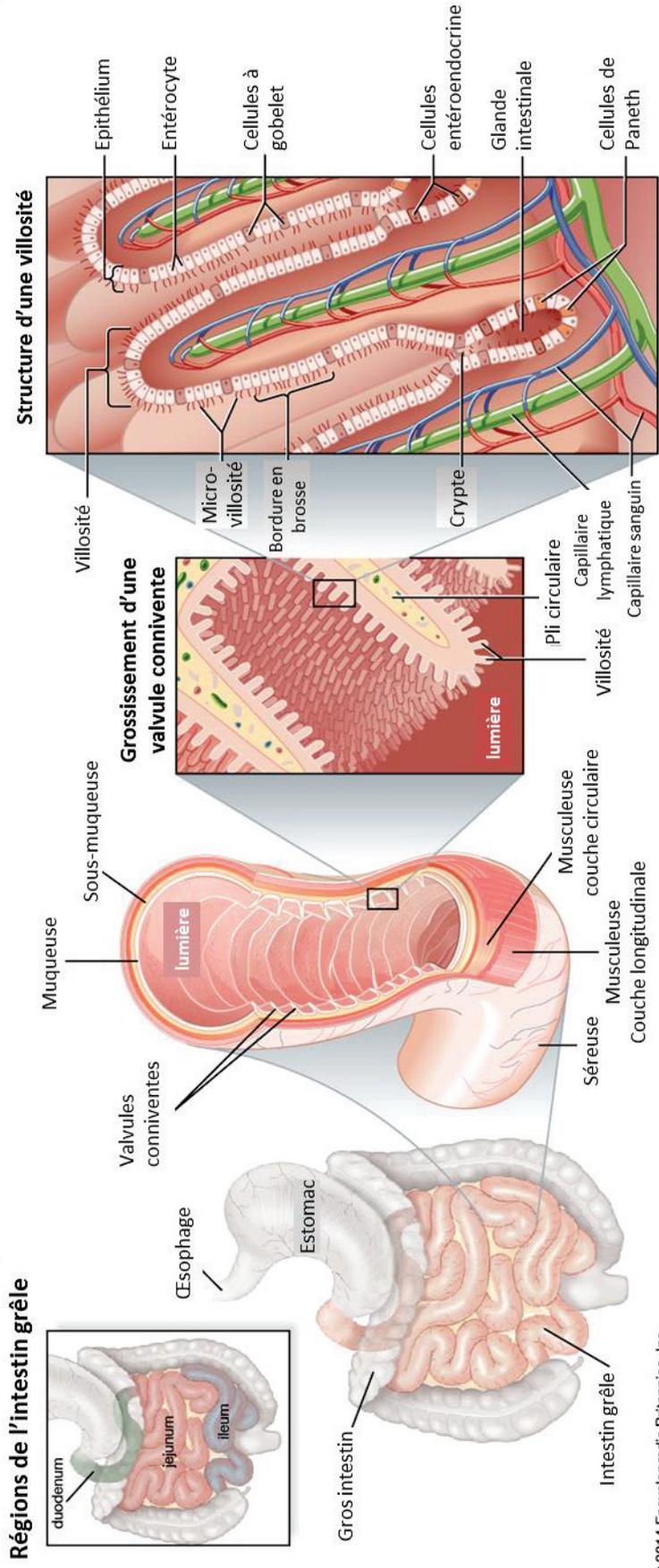


Figure 7 : Anatomie et histologie de l'intestin grêle humain. Source : adapté de (Encyclopædia Britannica Online, 2014), par courtoisie de l'Encyclopædia Britannica, Inc., copyright 2014; utilisée avec permission.

- **Les cellules de Paneth** situées au fond des cryptes protègent la barrière intestinale contre les agents pathogènes et permettent de maintenir l'homéostasie du microbiote. Pour cela, elles synthétisent et sécrètent des peptides antimicrobiens comme le lysozyme et les défensines. Elles sécrètent également de la phospholipase A2. De plus, elles produisent des facteurs de croissance impliqués dans le renouvellement de l'épithélium (T. Sato et al., 2011).

L'épithélium intestinal se renouvelle intégralement de façon très rapide, en moyenne tous les 3 jours chez la souris et tous les 5 jours chez l'Homme. Les cellules souches qui se trouvent dans les cryptes donnent naissance à tous les types cellulaires (Potten et al., 1990). Les cellules souches se divisent en cellules filles progénitrices qui migrent le long des cryptes. Ces cellules progénitrices stoppent leur prolifération au tiers de la hauteur des cryptes où elles commencent leur différenciation. La différenciation des cellules se poursuit le long des villosités. Les entérocytes sont pleinement différenciés dans la partie supérieure des villosités (Mariadason et al., 2005). Ce renouvellement rapide de l'ensemble des cellules de l'épithélium laisse à penser que l'intestin a une grande capacité d'adaptation à son environnement extérieur et notamment face à la quantité et à la qualité des nutriments digérés. Il a été montré que les lipides peuvent promouvoir la prolifération des cellules intestinales (Buts et al., 1990; Petit, Arnould, et al., 2007).

2.1.3 Le microbiote intestinal

Nous hébergeons dans notre tractus digestif une importante population microbienne connue sous le nom de microbiote intestinal. Chaque individu hébergerait 10^{14} bactéries dans son intestin. Une étude très récente remet en cause ce nombre et indique qu'il y aurait $3,9 \cdot 10^{13}$, avec une possible marge d'erreur de 25 % (Sender et al., 2016). La répartition de ces bactéries le long du tube digestif n'est pas homogène, la densité maximale est atteinte au niveau du côlon, avec 10^{11} bactéries par gramme de contenu. Ces microorganismes qui colonisent notre système digestif et établissent une symbiose qui durera toute la vie, sont indispensables pour le maintien de nombreuses fonctions essentielles à notre organisme (Gérard et al., 2007):

- dégradation des composés d'origines alimentaires indigestibles,
- protection contre la colonisation d'autres microorganismes pathogènes en transit avec le bol alimentaire,
- développement et maturation du système immunitaire intestinal et
- développement du tube digestif et physiologie intestinale.

Nous verrons plus loin (paragraphe 2.5.5) que le microbiote peut contribuer au métabolisme des lipides résiduels atteignant le colon et inversement que ces lipides peuvent influencer la composition du microbiote.

2.1.4 Le gel de mucus

Le gel de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal est composé d'environ 95% d'eau et 5% de mucines, des glycoprotéines sécrétées par les cellules à gobelet. Le gel de mucus dans l'intestin grêle et le côlon est constitué majoritairement de la mucine MUC2 (Pelaseyed et al., 2014). La composition et la structure du gel de mucus varie de façon importante le long du tractus digestif. Ainsi dans l'intestin grêle, le gel de mucus est fragile car il est composé d'une unique couche de mucus « lâche » non ancrée aux cellules épithéliales. Dans le côlon, le mucus est organisé dans un système à deux couches. Une couche interne dense et adhérente à l'épithélium dans laquelle les bactéries ne peuvent pas pénétrer et une couche externe lâche ne présentant aucun ancrage et pouvant être pénétrée par les bactéries (Figure 8). Les deux couches sont constituées de MUC2 mais dans la couche externe les polymères de MUC2 sont clivés par des enzymes protéolytiques qui augmentent considérablement leur volume et donc la taille des mailles du gel de mucus (Johansson et al., 2013).

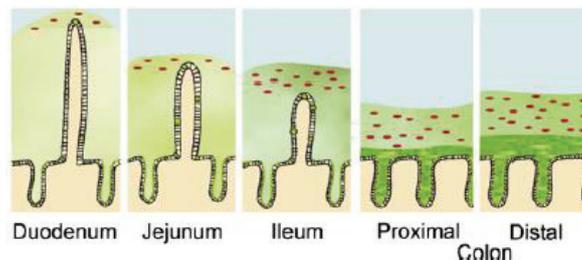


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation du mucus dans l'intestin grêle et le côlon.
Source : (Pelaseyed et al., 2014). Le mucus est en vert et les bactéries en rouge.

Une telle différence de structure du mucus entre l'intestin grêle et le côlon peut s'expliquer par des différences de fonctions et d'environnement des deux zones. En effet l'intestin grêle est le lieu de l'absorption des nutriments et la présence d'une seule couche lâche de mucus permet sans doute un passage facilité des nutriments et une meilleure absorption. De plus, peu de bactéries sont présentes à ce niveau expliquant donc une moindre protection, en outre déjà assurée par les cellules immunitaires telles que les cellules de Paneth (voir paragraphe 2.1.2). En revanche le côlon contient une plus grande population de bactéries qui résident dans la couche externe du gel de mucus. Les bactéries utilisent les chaînes oligosaccharidiques de MUC2 comme source d'énergie (Pelaseyed et al., 2014). Environ un tiers du génome du microbiote correspond à des gènes impliqués dans la digestion des glucides (Pelaseyed et al., 2014). Parmi les bactéries les plus abondantes du microbiote on trouve l'espèce *Akkermansia muciniphila* qui dégrade mucus et l'utilisent comme source d'énergie (Derrien et al., 2004).

2.2 Digestion des lipides

2.2.1 Hydrolyse

2.2.1.1 Hydrolyse buccale et gastrique

La digestion des aliments commence dès leur mastication qui stimule la production de salive et d'enzymes digestives au niveau buccal. Cette étape est essentielle car elle permet la lubrification, le mélange et une première émulsification des aliments. L'existence d'une lipase linguale chez l'Homme capable d'hydrolyser les TG a été démontrée (Hamosh, 1990; Hamosh et al., 1977) mais son rôle et sa significativité dans la digestion des lipides restent débattus (Moreau et al., 1988). Récemment, il a été montré dans une étude en collaboration avec notre équipe une activité lipasique dans la salive chez l'Homme ainsi que des différences de cette activité selon leur IMC (normo-pondéré vs obèse) (Vors et al., 2015). La lipase linguale jouerait un rôle plutôt qualitatif que quantitatif sur la digestion des TG. Elle permettrait la libération d'une très petite quantité d'acides gras non estérifiés (AGNE) qui serait détectée par les cellules neuro-sensorielles des bourgeons du goût via le récepteur CD36. Cette détection entraînerait à terme l'augmentation des sécrétions du tractus digestif permettant la digestion et l'absorption des lipides (Laugerette et al., 2005) ainsi que la mobilisation des lipides stockés par l'entérocyte (Mattes, 2005). Cependant les AGNE naturellement présents dans les aliments pourraient également contribuer à ce processus (Kulkarni et al., 2014). Le rôle de la lipase linguale serait plus déterminant chez les nouveaux-nés et les jeunes enfants car l'activité de leur lipase pancréatique est plus faible (Fredrikzon et al., 1982).

La digestion des TG commence donc de façon significative dans l'estomac, dont les cellules principales sécrètent une lipase acide (pH 3,5-6) directement sous forme active appelée lipase gastrique. Cette lipase serait responsable de la digestion d'environ 5 à 37 % des TG (M. Armand et al., 1994; Carriere et al., 1993). Son action se fait à l'interface huile/eau des gouttelettes lipidiques et consiste à hydrolyser les TG, préférentiellement en position *sn*-3, pour former des DG et des AGNE et quelques MG (Hamosh, 1990). Les LP ne sont quant à eux hydrolysés ni par la lipase linguale, ni par la lipase gastrique. L'activité péristaltique de l'estomac propulse le chyme gastrique vers le duodénum et commence à émulsifier les lipides.

Les MG, DG et AGNE générés par la lipase gastrique et les LP naturellement présents dans le chyme agissent comme produits tensioactifs et permettent de stabiliser les gouttelettes lipidiques. En revanche ces produits tensioactifs s'accumulent à l'interface des gouttelettes réduisant aussi l'action de la lipase gastrique sur les TG (Pafumi et al., 2002) ce qui peut expliquer sa contribution relativement faible à la digestion des TG. Cette étape conditionne l'activité ultérieure de la lipase pancréatique.

2.2.1.2 Hydrolyse Duodénale

Dans le duodénum, les AG à chaînes courtes et moyennes générés au niveau gastrique sont directement absorbés et représentent ainsi une source d'énergie rapidement utilisable par l'organisme. Les acides gras à chaîne longue (AGLC) produits lors de l'hydrolyse gastrique stimulent la sécrétion de cholécystokinine (CCK) qui ralentit la vidange gastrique et stimule à son tour la sécrétion de suc pancréatique et la libération de la bile par contraction de la vésicule biliaire. Le suc pancréatique contient plusieurs lipases, dont la lipase pancréatique, la « carboxyl ester lipase » (CEL) et la phospholipase A2 (PLA2). L'hydrolyse des TG et des DG résiduels de l'hydrolyse gastrique se poursuit alors par l'action combinée de la lipase pancréatique et d'une colipase à un pH compris entre 6,5 et 9. La colipase sert d'ancrage à la lipase pancréatique, lui permettant de se fixer à l'interface des gouttelettes lipidiques recouvertes de sels biliaires. Elle est le seul agent connu à ce jour capable de lever l'inhibition exercée par les sels biliaires et les AG libres générés sur l'hydrolyse duodénale des TG (Borgstrom, 1975; Wilde et al., 2011). Cette étape d'hydrolyse duodénale permet l'hydrolyse de 40 à 73 % des TG alimentaires (Carriere et al., 1993) (Figure 9).

La CEL, précédemment nommée « cholestérol estérase » ou « lipase stimulée par les sels biliaires », est également sécrétée par le pancréas. Cette lipase est capable d'hydrolyser différents types de substrats : les esters de cholestérols, les TG, DG, MG, les phospholipides, les lysophospholipides et les céramides. Elle sert probablement de protéine relais pour les autres enzymes lipolytiques pour une digestion et absorption complète des lipides (M. Armand, 2007; Hui et al., 2002).

Les glycérophospholipides sont principalement hydrolysés par la PLA2 en position *sn*-2 qui libère des AGNE et des lysophospholipides (Figure 9). Une activité de type phospholipase A1 peut aussi survenir dans le jus pancréatique, attribuée à la lipase pancréatique (de Haas et al., 1965).

A ce jour il n'existe pas de données indiquant un passage de la sphingomyéline (SM) intacte dans les cellules intestinales (Duan et al., 2009; Nilsson, 1968). La SM est hydrolysée par la sphingomyélinase alcaline (*alkaline sphingomyelinase* ou Alk-SMase ou ENPP7) en céramide (Cer) et PC. Les Cer ne semblent pas non plus pouvoir pénétrer dans les cellules et sont à leur tour hydrolysés par la céramidase neutre (*neutral ceramidase* ou N-CDase) donnant la sphingosine et un acide gras libre qui seront tous les deux absorbés par l'enterocyte (Figure 9). L'Alk-SMase et la N-CDase sont des ectoenzymes, c'est à dire des enzymes qui se trouvent à la surface des cellules (Duan et al., 2009). L'Alk-SMase est exprimée de façon importante dans l'intestin grêle et plus particulièrement dans la partie centrale du jéjunum et peut être relâchée dans la lumière du tube digestif par les sels biliaires et la trypsine pancréatique. La SM peut donc être hydrolysée dans la lumière et dans la muqueuse intestinale. Une fois relâchée la forme active de l'enzyme peut atteindre le côlon (J. J. Liu et al.,

2000). Il a été montré chez le rat que la digestion de la SM est longue et limitée quantitativement, en comparaison avec les glycérophospholipides et les AG. Une proportion de 25% de la dose ingérée est retrouvée dans les fèces, essentiellement sous forme de céramide, quelle que soit la dose de SM absorbée (Nilsson, 1968). *In vitro*, les glycérophospholipides et leur produits d'hydrolyse ont été montrés comme inhibant l'activité de l'Alk-SMase en présence de sels biliaires, d'une façon dose dépendante avec le degré d'inhibition suivant PS > PI > PC > PE (J. J. Liu et al., 2000).

2.2.2 Micellisation des produits d'hydrolyse.

Les produits de dégradation des deux hydrolyses successives sont associés aux sels biliaires et aux stérols pour former des micelles mixtes qui gagnent la bordure en brosse des entérocytes afin d'être absorbés. Les AGLC et les MG sont très peu solubles en milieu aqueux, cette forme micellaire améliore leur solubilité et permet leur transport. Les acides gras à chaînes courte et moyenne sont plus hydrosolubles et ne nécessitent donc pas la présence de sels biliaires pour être absorbés.

2.3 Absorption intestinale

Les AGLC étant très hydrophobes, des mécanismes permettant leur digestion puis leur transport dans l'organisme sont mis en place. Les AGLC sont dispersés dans des micelles mixtes dans la lumière de l'intestin, comme décrit dans le paragraphe précédent, puis ils sont associés à des protéines solubles qui se lient aux lipides dans les cellules intestinales. Enfin après ré-estérification ils sont sécrétés dans la lymphe sous la forme de lipoprotéines riche en TG.

2.3.1 Libération des AGLC des micelles : rôle de la couche d'eau non agitée.

D'un point de vue physiologique, la lumière de l'intestin est le lieu d'une structure unique recouvrant les cellules intestinales au niveau apical, la couche d'eau non agitée. Cette couche est constituée de molécules d'eau piégées dans un réseau complexe de glycoprotéines. Elle est caractérisée par un gradient de pH faible généré par un antiport H⁺/Na⁺ situé dans la bordure en brosse (Shiau et al., 1985). Les AGLC traversent la couche d'eau non agitée dans les micelles mixtes et lorsque le pH de celle-ci devient inférieur à leur pKa, ils se protonent et sont ainsi relâchés.

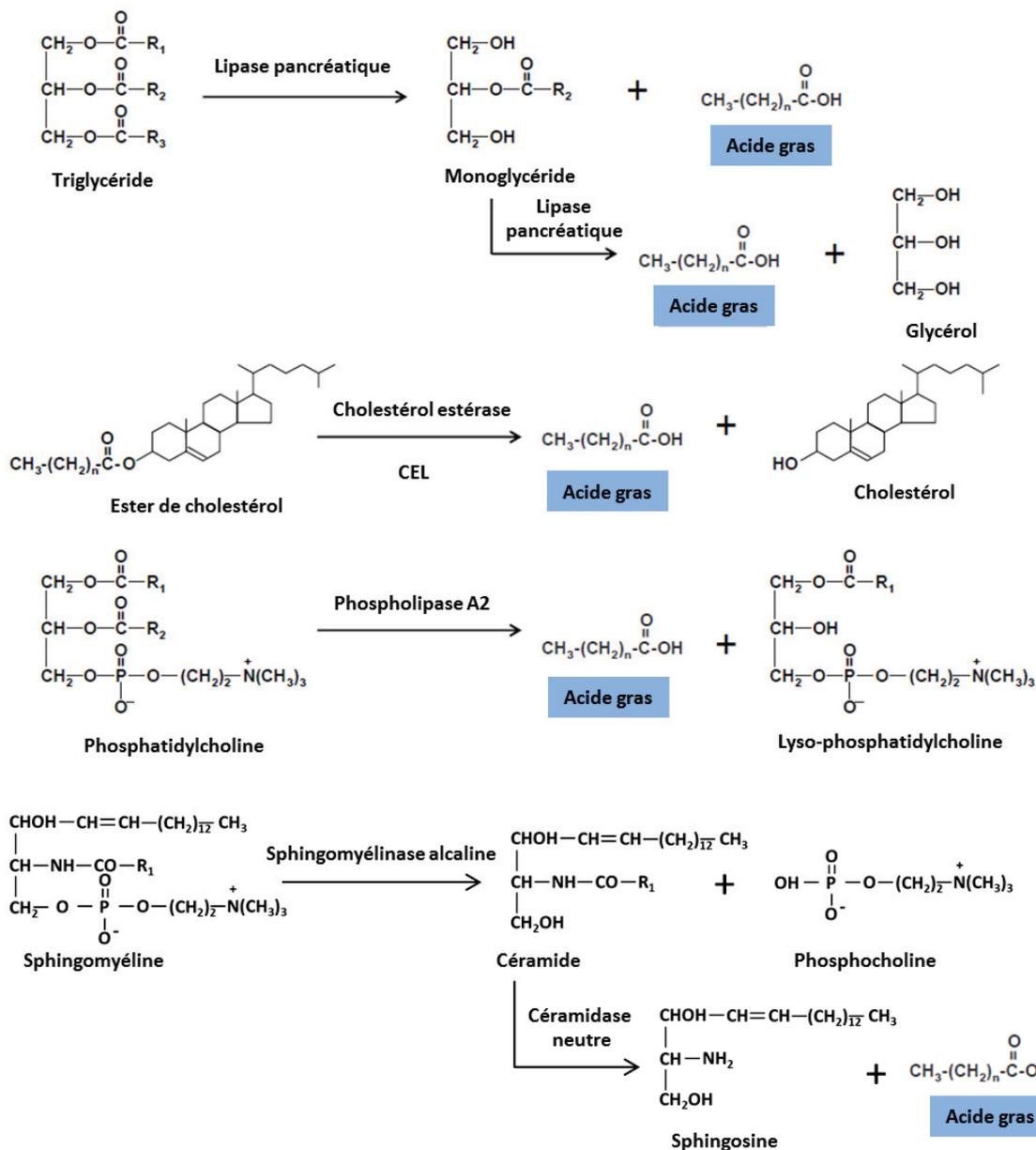


Figure 9 : Hydrolyse des lipides neutres et polaires dans l'intestin grêle. Source : adapté de (T. Y. Wang et al., 2013)

2.3.2 Captage des AGLC par les cellules.

Les AGLC sont-ils capables de traverser seuls la membrane plasmique des cellules de façon passive ou ont-ils besoin de recourir à des protéines de transport ? Cette question controversée fait débat dans la communauté scientifique ces dernières années (Buttet et al., 2014; Niot et al., 2009). Il est probable que les deux mécanismes, transport direct et transport facilité, soient nécessaires pour un captage optimal des AGLC (Figure 12).

2.3.2.1 Diffusion passive

Le pKa des AGLC étant inférieur à 5, plus de 99% des AGLC sont ionisés au pH physiologique (McArthur et al., 1999). Il a été montré dans des modèles *in vitro* simples, comme des liposomes, que la traversée d'une bicouche de phospholipides par un AGLC se ferait en trois temps : (i) l'adsorption correspondant à la fixation de l'AGLC sur la surface de la membrane (Zakim, 2000), (ii) le mouvement de « flip-flop » de l'AGLC de l'hémi-membrane externe vers l'hémi-membrane interne et (iii) la désorption de l'AGLC de l'hémi-membrane interne vers l'intérieur de la vésicule (Kamp et al., 1995). Un AGLC protoné pourrait facilement traverser une bicouche de phospholipides cependant la simplicité du modèle utilisé est une limitation majeure de ces résultats.

Dans un modèle d'absorption intestinale, les cellules Caco-2 lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique, il a été montré que le transport des AGLC est saturable si leur concentration est faible (Trotter et al., 1996). De plus, il semble y avoir une inhibition compétitive entre les AGLC qui ont une structure proche (Tranchant et al., 1998). Ces données supportent l'hypothèse que l'absorption des AGLC implique un transport facilité via des protéines. L'identification de protéines ayant une forte affinité pour les AGLC dans la bordure en brosse des entérocytes vient renforcer cette hypothèse.

2.3.2.2 Transport actif par des protéines membranaires

Quatre protéines intestinales présentes à la membrane apicale entérocytaire ont été mises en évidence pour leur haute affinité pour les lipides.

- **FABPpm** est une protéine de 43 kDa, localisée dans les tissus à fort métabolisme lipidique comme le cœur, le foie et l'intestin grêle. Au niveau intestinal elle est exprimée principalement dans le jéjunum et de façon moindre dans l'iléon où elle est localisée au niveau apical et basolatéral des entérocytes (Stremmel et al., 1985). L'incubation d'explants jéjunaux avec des anticorps anti-FABPpm entraîne une diminution significative de l'absorption d'acide oléique par les cellules suggérant un rôle de cette protéine dans le captage des AGLC (Stremmel, 1988). Cependant, l'inhibition de ce captage n'existe que dans le cas de fortes concentrations en anticorps. La FABPpm a également été trouvée au niveau des cellules des cryptes non

impliquées dans le captage des AG et des transfusions de FABPpm au niveau d'ovocytes de xénopes n'altèrent pas le transfert des AG (S. L. Zhou et al., 1995). Son rôle dans le captage des AGLC reste donc imprécis et débattu. Plus récemment, une nouvelle fonction a été suggérée pour cette protéine : le contrôle du ratio cytoplasmique/mitochondrial de NADH/NAD suggérant un lien potentiel entre captage des AG et potentiel redox (Buttet et al., 2014).

- **FATP4** est une protéine de 63 kDa surtout présente dans le jéjunum, un peu dans le duodénum et non présente dans le côlon ce qui corrèle avec l'absorption lipidique. Dans l'intestin, la FATP4 a été initialement localisée dans les membranes des entérocytes (Stahl et al., 1999), mais des études récentes indiquent qu'elle serait majoritairement présente dans le réticulum endoplasmique (RE) (Garcia-Martinez et al., 2005; Milger et al., 2006). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent une implication de FATP4 dans l'absorption des AGLC mais son mécanisme d'action n'est pas établi (Gimeno et al., 2003; Stahl et al., 1999). FATP4 pourrait jouer un rôle indirect dans l'absorption lipidique au travers d'une acylation vectorielle des AGLC qui maintiendrait une concentration faible d'AGLC dans l'entérocyte et faciliterait ainsi leur diffusion passive (Hall et al., 2005). Cependant récemment Shim et al. ont montré que des souris invalidées pour FATP4 ne présentaient aucune différence en terme d'absorption des TG et de perte fécale en lipides en comparaison avec des souris sauvages. Cette absence de différence n'étant pas due à une induction compensatoire des autres LBP, les auteurs concluent que FATP4 n'est pas nécessaire à l'absorption des AGLC chez la souris (Shim et al., 2009). Par ailleurs, l'activité endogène d'acyl-CoA synthétase de FATP4 pourrait également jouer un rôle dans la synthèse et la sécrétion des LRT (Buttet et al., 2014).
- **CD36**, en plus de son rôle de senseur des matières grasses dans la cavité buccale décrit précédemment (paragraphe 2.2.1), serait impliqué dans le captage des AGLC dans l'entérocyte. Il s'agit en effet d'une protéine transmembranaire de 88 kDa avec une configuration en épingle à cheveux, structure de type récepteur, localisée dans la partie proximale de l'intestin grêle au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Son expression génique est augmentée par les régimes riches en lipides cependant plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'inactivation de son gène ne résulte pas en une moindre absorption des AGLC (Drover et al., 2005; Goudriaan et al., 2002; Tran et al., 2011). CD36 jouerait un rôle dans l'absorption initiale des AG mais deviendrait rapidement saturée ce qui limiterait sa contribution globale au captage des AG (Abumrad et al., 2012; Hennessy et al., 2014). Il est à noter que des déficiences en CD36 chez l'Homme ont été associées à la sécrétion de lipoprotéines beaucoup plus petites que des chylomicrons, suggérant un rôle de CD36 dans le transport des lipides intracellulaire et/ou dans le RE (Abumrad et al., 2012; Masuda et al., 2009).

- **La cavéoline-1** (Cav-1) est une petite protéine membranaire (22 kDa) associée aux radeaux lipidiques au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Elle est connue pour sa capacité à se lier au AG (Trigatti et al., 1999). Cette protéine joue un rôle important dans l'activité des cavéoles et pourrait être impliquée dans le captage des AGLC par endocytose (Pilch et al., 2011). En effet, la calvéolin-1 a été détectée dans des vésicules calvéoliques dans le cytosol des cellules (S. Siddiqi et al., 2013). De plus, il a été montré que des souris invalidées pour le gène Cav-1 sont résistantes à un régime obésogène mais présentent une hypertriglycéridémie à jeun et en postprandiale qui n'est pas due à des modifications de la lipoprotéine lipase, suggérant un rôle de Cav-1 dans l'absorption des AGLC au niveau des adipocytes et donc de l'intestin (Razani B, JBC 2002).
- **SR-BI** est une glycoprotéine (82 kDa) exprimée dans la partie proximale de l'intestin au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (Hauser et al., 1998). SR-BI, comme CD36, est un récepteur "éboueur" (*scavenger* en anglais) capable de se lier de façon spécifique à un large spectre de ligand. Son rôle dans le captage du cholestérol au niveau intestinal reste incertain, avec des résultats contradictoires obtenus chez la souris (Bietrix et al., 2006; Mardones et al., 2001) et *in vitro* (Cai et al., 2001; Levy et al., 2004). Le transporteur principal du cholestérol restant à ce jour NPC1L1 (Altmann et al., 2004). C'est plus récemment que son rôle de "senseur" de lipides a été découvert. En effet, plusieurs études ont suggéré que la détection des lipides alimentaires par les entérocytes impliquait leur reconnaissance sous leur forme physiologique c'est-à-dire les micelles postprandiales (Beaslas et al., 2008; Chateau et al., 2005; Morel et al., 2004). Cette hypothèse a été confirmée dans une étude *in vitro* sur cellules Caco-2 montrant que l'absorption des micelles lipidiques par les cellules impliquait leur interaction avec le récepteur SR-BI (Beaslas et al., 2009).

Pour résumé, ces protéines n'ont sans doute pas comme initialement soutenu un rôle majeur dans le transport direct de lipides dans l'entérocyte mais plutôt un rôle indirect permettant une meilleure diffusion passive des AGLC.

2.4 Le transport cytosolique des AGL

Une fois absorbés dans le cytosol, les AGLC sont pris en charge par des « fatty acid binding protein » (FABP). Dans l'intestin il y a deux FABP fortement exprimées, l'*Intestinal-FABP* (ou I-FABP) présente uniquement dans cet organe et la *Liver-FABP* (ou L-FABP) que l'on trouve également dans le foie et dans les reins. Elles sont aussi connues sous le nom respectivement de FABP2 et FABP1. Ces deux FABP transfèrent les AGLC, les MG et les lysophospholipides vers les différents organites entérocytaires (RE, Golgi). Il y a une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines qui permet

une absorption lipidique correcte. Néanmoins elles diffèrent par leur structure ce qui leur confère certaines spécificités. En effet, I-FABP ne peut fixer qu'un seul AGLC et requiert une interaction de type collision pour transférer cet AGLC aux organites cellulaires (Petit, Niot, et al., 2007). La L-FABP peut fixer deux AGLC ainsi que les MG et les lysophospholipides mais aussi d'autres molécules hydrophobes comme les sels biliaires et le cholestérol (Cistola et al., 1989; Petit, Niot, et al., 2007). La L-FABP exerce son transfert par simple diffusion aqueuse. Les AGLC délivrés au pôle apical sont préférentiellement pris en charge par la I-FABP indiquant que son système de transport dynamique est sans doute le plus favorable (Alpers et al., 2000).

Afin d'être métabolisés les AGLC doivent être estérifiés par le coenzyme A. Cette estérification a lieu au niveau des organites cellulaires par l'action d'une enzyme, l'acyl-coenzyme A synthase. Les AGLC-CoA ainsi formés sont ensuite directement métabolisés ou pris en charge par l'acyl-coenzyme A binding protein (ACBP) pour constituer un pool d'attente intracellulaire (Petit, Niot, et al., 2007). Cette prise en charge pourrait également participer au maintien d'un gradient de concentration favorable à l'influx d'AGLC dans la cellule.

2.5 Assemblage et sécrétion des chylomicrons

2.5.1 Resynthèse intracellulaire des TG et LP

La réestérification des AG-CoA a lieu dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) via deux voies enzymatiques : la voie du 2-monoglycéride, prépondérante en période postprandiale (plus de 75 % des TG néosynthétisés) et la voie du glycérophosphate, prépondérante en période interprandiale et de jeûne (Figure 10).

Triglycérides

Par la voie du 2-monoglycéride, un AG-CoA est transféré à un MG sous l'action de l'acyl-CoA-monoacylglycerol acyltransferases (MGAT) pour former un 1,2-DG. La voie du glycérophosphate quant à elle, recrute l'enzyme glycérophosphate acyltransférase (GPAT) pour former l'acide phosphatidique à partir d'AG-CoA. Sous l'action de l'enzyme phosphatidate phosphohydrolase, l'acide phosphorique est hydrolysé en 1,2-DG. Enfin dans les deux voies la dernière étape consiste en la ré-estérification des 1,2-DG en TG par les acyl-coA-diacylglycerol acyltransferases ou DGAT (DGAT1 et DGAT2). DGAT2 se trouve du côté cytosolique de la membrane du RE tandis que DGAT1 est localisée du côté luminal. Les TAG générés par DGAT1 sont immédiatement disponibles pour la synthèse des lipoprotéines tandis que ceux générés par DGAT2 sont principalement stockés sous la forme d'un pool cytosolique (Niot et al., 2009).

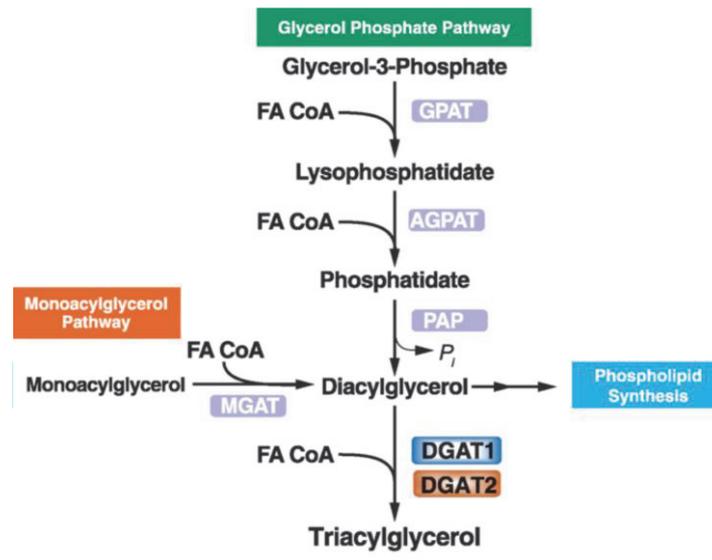


Figure 10 : La voie des 2-monoglycérides et la voie du glycérophosphate menant à la formation des TG et des phospholipides. Source : (Yen et al., 2008)

Lipides polaires

Les DG formés au cours des deux voies peuvent également former des phospholipides sous l'action de la phosphocholine diacylglycérol acyltransférase.

La lysoPC absorbée par la cellule peut être recyclée en PC ou hydrolysée par une lysophospholipase et former la glycéro-3-phosphorylcholine et un AGL (Nilsson, 1968; Y. Sato, 1970). L'AGL est utilisé pour la synthèse de TG, et la glycéro-3-phosphorylcholine est directement transportée via la veine portale au foie (Le Kim et al., 1976). Par ailleurs, deux molécules de lysoPC peuvent se combiner pour former de la PC et de la glycéro-3-phosphorylcholine (Erbland et al., 1965). La PC reformée dans la cellule joue un rôle important dans la formation des lipoprotéines mais aussi dans la synthèse de SM (Nilsson et al., 2006). Les céramides sont produits au niveau du RE par l'action de la palmitoyl-CoA-serine (synthèse de novo) ou à partir de sphingosine par la céramide synthase. Puis la sphingomyéline synthase catalyse leur combinaison avec la phosphocholine (dérivée de la PC) pour former la SM. Il existe deux isoformes principales de la sphingomyéline synthases (SGMS) qui diffèrent notamment par leur localisation dans la cellule. Ainsi, la SGMS 1 se situerait dans la membrane du Golgi et la SGMS 2 au niveau de la membrane plasmique (Tafesse et al., 2006) (Figure 11).

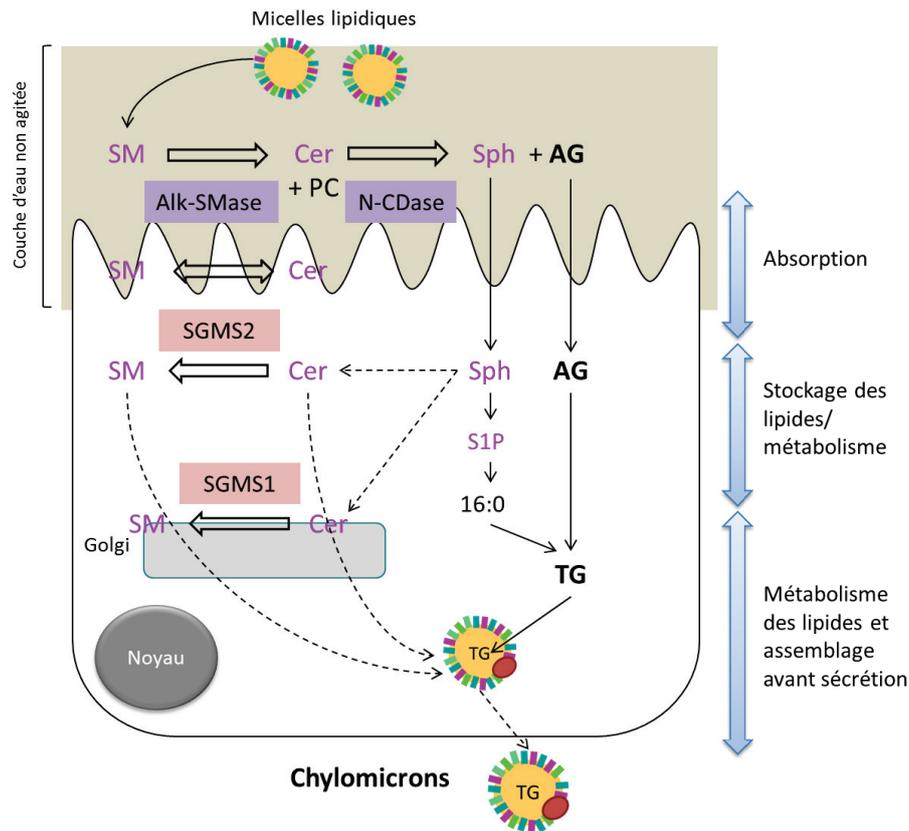


Figure 11 : Métabolisme de la sphingomyéline par l'entérocyte. Source : adapté de (Nilsson et al., 2006).

2.5.2 Synthèse et stockage de gouttelettes lipidique dans l'entérocyte

Des gouttelettes lipidiques ont été observées dans le cytosol d'entérocytes jéjunaux durant l'absorption des lipides sur des cellules Caco-2 (Chateau et al., 2005), chez les rongeurs (Mansbach et al., 2000), le porc (Hansen et al., 2003) et l'Homme (Robertson et al., 2003). Lors d'un afflux important de lipides alimentaires, la ré-estérification des AG-CoA en TG peut devenir plus importante que leur transferts aux citernes du RE, les TG s'accumulent alors à la surface cytoplasmique du RE et/ou viennent former des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Mansbach et al., 2000). Ces gouttelettes sont probablement recouvertes d'une couche de LP comme observé dans le foie (Tauchi-Sato et al., 2002). Des études récentes ont montré que leur présence est transitoire (Lee et al., 2009; Zhu et al., 2009). Ce stockage transitoire des lipides permet (i) d'éviter une concentration trop élevée en AGL dans le cytosol qui serait toxique et (ii) de former des lipoprotéines en périodes interprandiales. Leur contenu lipidique étant utilisé à terme pour la production de chylomicrons, les gouttelettes lipidiques peuvent être considérés comme un important facteur du contrôle de la triglycéridémie postprandiale.

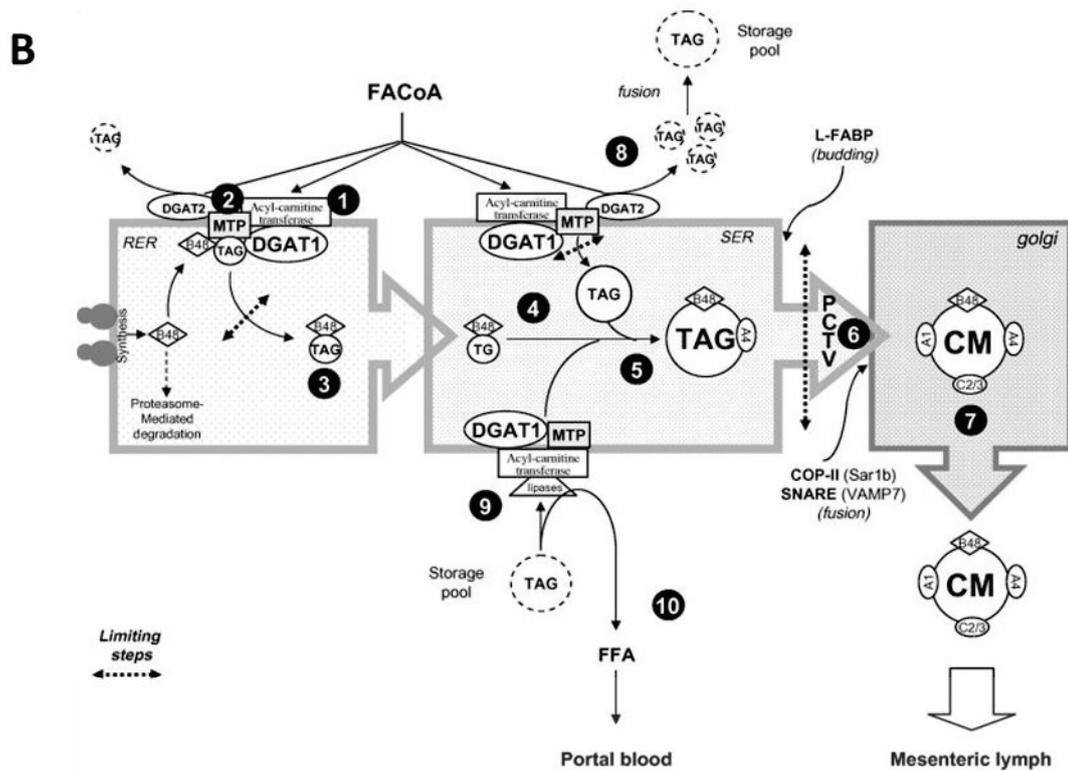
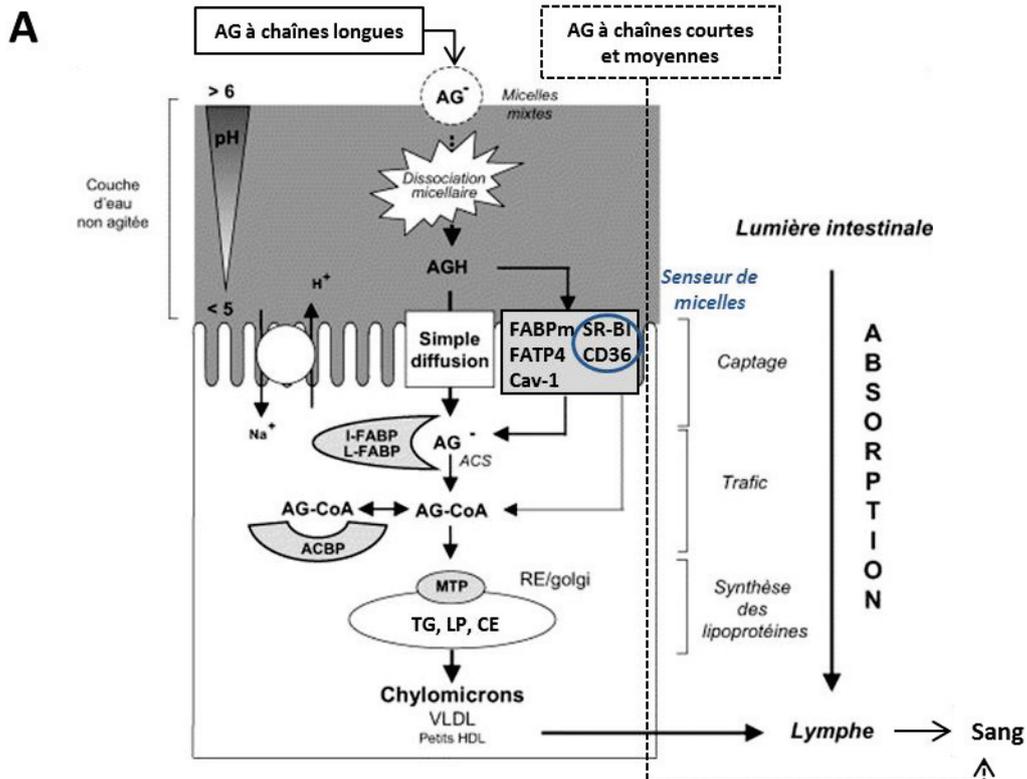


Figure 12 : Captage et devenir intracellulaire des acides gras (A) et mécanisme détaillé de synthèse des chylomicrons (B). Source : (A) adapté de (Petit, Niot, et al., 2007) et (B) (Niot et al., 2009).

2.5.3 Synthèse des chylomicrons

La quantité de lipides alimentaires ingérés a une forte influence sur le type de lipoprotéines synthétisées et sécrétées par l'intestin. En effet en période de jeûne ou inter-prandiale, des VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) sont formées tandis qu'en période postprandiale, des CM sont principalement produits. Ces deux types de lipoprotéines sont notamment distingués par leur coefficient Svedberg de flottation, supérieur à 400 dans le cas de chylomicrons et entre 20 et 40 pour les VLDL (Lindgren et al., 1972). Les CM sont de grandes lipoprotéines riches en TG qui transportent les lipides d'origine alimentaire de l'intestin grêle jusqu'aux autres parties de l'organisme. Leur synthèse se déroule en trois étapes (Figure 12).

- Les TG et les esters de cholestérol nouvellement formés au niveau de la membrane sont transportés jusqu'aux citernes du RE rugueux par la protéine microsomale de transfert des TG, la MTP ou MTTP. Ils s'assemblent alors à l'apolipoprotéine B48 (ApoB48) ainsi qu'avec des LP (principalement de la PC) et du cholestérol libre. La MTTP interagit physiquement avec l'apoB48 et permet le transfert des lipides sur celle-ci (Hussain et al., 2012). Récemment il a été montré qu'elle peut transférer les SM et les céramides (Iqbal et al., 2015). Elle protège également l'apoB48 d'une protéolyse intracellulaire par le système ubiquitine/protéasome (Hussain et al., 2003). Ainsi, la MTTP est essentielle pour la formation des CM comme le confirme l'inactivation de son gène au niveau intestinal chez la souris qui provoque une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et une diminution de la sécrétion de CM (Xie et al., 2006).

- Dans un second temps, la resynthèse de TG et d'esters de cholestérol se poursuit dans le RE lisse et conduit à la formation de gouttelettes lipidiques toujours via l'action de la MTTP. Ces deux types de particules (gouttelettes lipidiques et lipoprotéines primordiales) fusionnent. L'incorporation d'apolipoprotéine A-IV vient stabiliser ces lipoprotéines naissantes appelées pré-CM (Niot et al., 2009).

- Les pré-CM sont transférés au Golgi. Ce transfert constitue la deuxième étape limitante dans la formation des chylomicrons. Les pré-CM sont transportés au travers de la membrane du RE lisse, bourgeonnent et forment les PCTV (*pre-chylomicron transport vesicle*) qui sont fusionnées avec la membrane du Golgi puis sont délivrés aux «citernes» du Golgi. Plusieurs protéines sont impliquées dans ce processus. L-FABP, permet la déformation de la membrane du RE lisse et la formation des PCTV (Neeli et al., 2007), notamment par le recrutement d'autres protéines : vesicle associated membrane protein (VAMP7), apoB48, CD36 et le complexe COP II (S. Siddiqi et al., 2010). L-FABP est présente dans le cytosol des entérocytes sous la forme d'un complexe contenant également : Sec13, SVIP et Sar1b. La liaison de L-FABP au RE est conditionnée par sa rupture avec ce complexe. Cette

rupture est rendue possible par la phosphorylation de Sar1b (S. Siddiqi et al., 2012), elle-même contrôlée par la protéine PKC- ζ (S. A. Siddiqi et al., 2008). Des mutations du gène de Sar1b sont à l'origine chez l'Homme de la maladie d'Anderson ou maladie de rétention anormale des CM caractérisée par une rétention des CM dans l'entérocyte (Jones et al., 2003).

- La maturation finale des CM a lieu dans le Golgi au travers de modifications post-translacionnelles telles que la glycosylation de l'apoB48 et l'ajout d'autres apolipoprotéines : Apo A-I, C-II and C-III (Niot et al., 2009). Les CM sont ensuite relâchés au pôle basolatéral des entérocytes directement dans la lymphe et rejoignent la circulation principale au niveau du canal thoracique (voir paragraphe 3.1). L'augmentation de TG à l'état postprandial est due en grande partie à l'arrivée massive des CM dans la circulation.

2.5.4 Composition et structure des chylomicrons

Les CM constituent l'une des classes principales de lipoprotéines avec les VLDL, IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*) et HDL (*High Density Lipoprotein*) (voir paragraphe 3.1). Les lipoprotéines permettent le transport des lipides hydrophobes dans le milieu aqueux sanguin et partagent une structure commune. Elles sont constituées d'un cœur de lipides neutres, TG et esters de cholestérol, recouvert de LP, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 13).

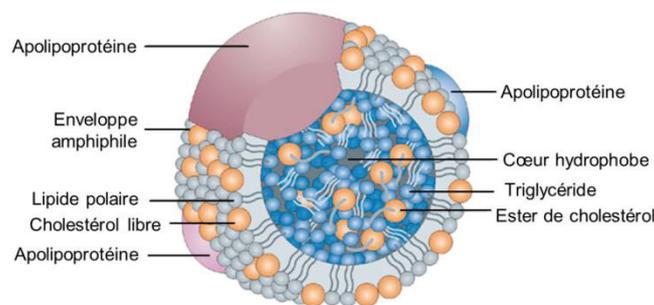


Figure 13 : Structure générale d'une lipoprotéine. Source : adapté de (Wasan et al., 2008)

Les apolipoprotéines assurent la cohésion du complexe lipidique et confèrent aux lipoprotéines leur identité, leur propriété fonctionnelle et leur devenir métabolique. En effet, présentes à la surface des lipoprotéines, elles servent de ligand aux récepteurs cellulaires et agissent comme cofacteur ou activateur de nombreuses enzymes plasmatiques. Par exemple, l'apoE est impliquée dans la captage hépatique des résidus de CM (Gautier et al., 2010). Ainsi, les différentes classes de lipoprotéines se distinguent par leur composition en lipides et en apolipoprotéines mais également par leur densité et leur taille (Table 3). La séparation des lipoprotéines selon leur densité par ultracentrifugation est actuellement la technique la plus utilisée (Gofman et al., 1949).

Les CM sont les lipoprotéines les plus grandes (75 à 1200 nm) et les moins denses ($d < 0,93$). L'apolipoprotéine B48 (apoB48) est la principale apolipoprotéine des CM. Elle est une forme tronquée de l'apoB100 (48% des premiers acides aminés de l'apoB100), synthétisée dans les entérocytes. Chaque molécule de CM possède une unique molécule d'apoB48 qui ne peut pas être échangée avec les autres lipoprotéines (Phillips et al., 1997).

Table 3 : Caractéristiques des principales lipoprotéines humaines. Source : (Vors, 2012)

Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Composition (% de la masse totale)					Principales apolipoprotéines	
			CL	LP	Apo	TG	CE		
LRT	Chylomicron	0,93	75-1200	2	7	2	86	3	B48, C, E
	VLDL	0,93-1,006	30-80	7	18	8	55	12	B100, C, E
	IDL	1,006-1,019	27-35	9	19	19	23	29	B100, C, E
	LDL	1,019-1,063	18-27	8	22	22	6	42	B100
	HDL	1,063-1,125	7-12	5	33	40	5	17	AI, AII, C

CE : cholestérol estérifié ; CL : Cholestérol libre ; HDL : high density lipoprotein ; IDL : intermediate density lipoprotein ; LDL : low density lipoprotein ; LP : lipide polaire ; LRT : lipoprotéine riche en TG ; TG : triglycéride ; VLDL : very low density lipoprotein.

Avec les VLDL, les CM constituent les lipoprotéines les plus riches en TG. Les CM sont constitués à 86 % de TG, 7% de lipides polaires, 2 % de protéines, le cholestérol libre et estérifié représentant le reste (Figure 13). Ward et al. ont étudié la composition fine en LP des CM de 12 hommes sains ayant consommés 20 g de beurre (Wood et al., 1964). Ils montrent ainsi que les LP constituent 9% de la masse des CM et qu'ils sont constitués de 78,5 % de PC, 11, 7% de SM et 5,6 % de PE. Les principaux AG retrouvés dans les différentes classes de LP sont également détaillés. Ainsi les PC sont constituées majoritairement de 16:0, 18:2 et 18:1 ; les SM de 16:0, 24 :1 et 22:0 et les PE de 18:0, 18:1 et 18:2.

Plusieurs études réalisées dans les années 1960 sur un très petit nombre de volontaires ont permis de mettre en évidence chez l'Homme l'influence des lipides du repas sur la composition lipidique des CM. En effet, dans une étude réalisée sur un seul homme, Zilvermist et al. montrent que selon le type de lipides consommés (huile de maïs vs crème), les quantités de TG, LP et cholestérol retrouvées dans les CM varient (Zilvermist, 1965). Chez deux volontaires sains, suite à la prise d'un repas riche en lipides, les CM retrouvés dans la lymphe ont une composition en AG similaire à celle du repas (Kayden et al., 1963). Schlierf et al. ont administré à un volontaire de la trioléine synthétique ou de l'huile d'avocat (variant par leur profil en AG), ils observent que la composition en AG de l'huile influence la composition en AG des esters de cholestérols des CM et dans une moindre proportion celle des PC et PE (Schlierf et al., 1969). Plus récemment, une étude a montré l'effet de différents AG

alimentaires sur la composition en AG des TG des CM. Dans une étude croisée, 16 hommes sains ont pris 5 repas hyper-lipidiques contenant la même quantité d'AG mais variant par leur type (acide palmitique, stéarique, oléique, linoléique ou élaidique). Les auteurs montrent que le profil en AG des TG des CM correspond au profil en AG du repas administré (Bysted et al., 2005).

La composition lipidique des CM, qui semble directement reliée au type de lipides ingérés, constitue un facteur important qui peut affecter le métabolisme des CM et leur athérogénicité.

2.5.5 Lipides non absorbés au niveau du côlon : une faible quantité mais un fort impact ?

Les lipides alimentaires ayant « échappé » à l'absorption intestinale, atteignent le côlon avant d'être excrétés dans les fèces. Chez l'homme, la quantité de lipides totaux qui atteint le côlon en conditions physiologiques a été estimée entre 5 et 8 g par jour, ce chiffre pouvant être considérablement augmenté en situations pathologiques (insuffisance pancréatique, résections intestinales...). Aux lipides d'origine alimentaire s'ajoutent les lipides d'origine bactérienne et les lipides endogènes provenant de la bile et de la desquamation de l'épithélium intestinal (Juste, 2005). Lors de leur passage dans le côlon, les lipides peuvent moduler la composition du microbiote intestinal. En effet chez des souris soumises à un régime riche en lipides, une chute de la diversité du microbiote intestinal est observée (Turnbaugh et al., 2008). De plus en plus d'études montrent un rôle du microbiote dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2. Il affecterait la balance énergétique (Turnbaugh et al., 2006), le métabolisme du glucose (Cani et al., 2007) et l'inflammation chronique associée à l'obésité (Cani et al., 2008). La modulation de la composition du microbiote par les lipides alimentaires est donc un enjeu majeur pour ces pathologies.

Si les lipides influent sur la composition du microbiote intestinal, les bactéries du microbiote ont quant à elles la capacité de transformer les lipides arrivant dans le côlon. En effet, les bactéries peuvent hydroxyler, oxyder ou réduire les AG. Certaines possèdent également des lipases, des phospholipases et des sphingomyélinases permettant d'hydrolyser les TG et LP. Certains métabolites produits ont des activités biologiques reconnues sur l'épithélium intestinal. Par exemple, les DG et les inositol triphosphates peuvent agir comme messagers intracellulaires et contrôler l'expression de certains gènes (Gérard, 2012; Juste, 2005).

En résumé, les lipides atteignant le côlon ont la capacité de moduler la composition du microbiote intestinal et par voie de conséquence ses fonctions et donc la santé de l'hôte. Le microbiote peut modifier les lipides et générer des métabolites actifs au niveau de l'épithélium intestinal. Dans ce contexte, la quantité et la qualité des lipides présents dans le côlon est directement reliée à celles des lipides du régime alimentaire. Les effets de la présence des LP ou de leurs produits d'hydrolyse au niveau du côlon ne sont pas connus à ce jour.

2.6 Impact des lipides polaires alimentaires sur la digestion, l'absorption des lipides et la lipémie postprandiale

2.6.1 Digestion

Pour agir les lipases doivent se fixer à l'interface lipide/eau des gouttelettes lipidiques dans le tractus digestif. Les propriétés de cette interface sont donc des facteurs majeurs de modulation de la lipolyse (Golding et al., 2010; Golding et al., 2011; M.-C. Michalski, 2009; Singh et al., 2009). La taille des gouttelettes lipidiques et leur stabilité sont des paramètres très importants (Gargouri et al., 1986; Golding et al., 2011). Concernant la taille, il a été montré que pour la même quantité de lipides, des globules de petite taille ($< 1 \mu\text{m}$) offrent une interface lipidique plus importante que des globules de grande taille ($10\mu\text{m}$) ce qui favorise l'activité des lipases gastrique et pancréatique (Martine Armand et al., 1992) et conduit à une hydrolyse gastrique et duodénale plus importante des TG chez des sujets sains (M. Armand, Borel, et al., 1996; M. Armand et al., 1999).

Cependant, une étude réalisée chez des nouveau-nés prématurés montre que l'hydrolyse gastrique de globules gras du lait maternel ($4 \mu\text{m}$) est plus importante (1,7 à 2,5 fois plus élevée) que celle de petites gouttelettes lipidiques issues d'une formule infantile ($0,6 \mu\text{m}$) (M. Armand, Hamosh, et al., 1996). Les globules gras du lait sont recouverts de trois couches de LP d'espèces différentes, de cholestérol ainsi que de protéines tandis que les particules de la formule infantile sont recouvertes principalement de PC. Ceci suggère qu'au-delà de la taille, l'organisation structurale mais aussi la composition de l'interface des gouttelettes, notamment en LP, sont des paramètres déterminants pour la lipolyse (M. Armand, 2007).

A cet égard, il a été montré *in vitro* que le type de LP présent à l'interface des gouttelettes impacte la lipolyse gastrique, celle-ci étant plus forte en présence de PC, PI ou PS mais plus faible en présence de SM (Favé et al., 2007). Cet effet pourrait être dû à des interactions spécifiques (électrostatiques et hydrophobiques) entre les domaines de liaison lipidique des lipases et les LP des gouttelettes lipidiques (Cajal et al., 2000).

Plusieurs études *in vitro* montrent que la lipolyse gastrique et duodénale sont plus importantes lorsque les gouttelettes lipidiques (à base d'huile de lin ou d'huile de colza ou de matière grasse laitière [MGLA]) sont recouvertes par des LP de soja plutôt que par des caséines ou un émulsifiant synthétique, le Tween 80 (Couedelo et al., 2015; Vors et al., 2012). De façon contradictoire Mun et al. montrent *in vitro* que la lipolyse duodénale d'une émulsion d'huile de maïs est plus faible si elle est stabilisée avec de la lécithine de soja plutôt qu'avec des caséines (Mun et al., 2007).

Très récemment, Mathiassen et al. ont montré qu'une huile de maïs émulsionnée avec des LP laitiers induit une augmentation de l'activité des lipases gastriques et pancréatiques (réalisé de façon séquentielle) en comparaison avec l'utilisation de lécithine de soja (Mathiassen et al., 2015).

2.6.2 Absorption et lipémie postprandiale

2.6.2.1 Impact différentiel des lipides polaires de soja et des protéines

Plusieurs études montrent un impact du type d'émulsifiant sur l'absorption intestinale des lipides et la synthèse des CM. Ainsi notre équipe a montré dans une étude sur cellules Caco-2/TC7 que l'incubation du milieu obtenu suite à la digestion *in vitro* d'émulsions stabilisées avec des LP de soja induit la sécrétion d'une moindre quantité de TG par rapport à une émulsification avec des caséines. Cela alors même que le milieu de digestion obtenus avec les LP de soja contenait plus d'AGL suite à une lipolyse gastrique plus élevée (Vors et al., 2012). Nous avons également montré récemment chez le rat que l'absorption intestinale et la sécrétion lymphatique d'acide alpha-linoléique sont augmentées avec l'utilisation comme émulsifiant de LP de soja tandis qu'elles sont diminuées avec les caséines en comparaison avec de l'huile seule. Les CM sécrétés sont plus gros et plus nombreux avec LP de soja et plus petits avec les caséines en comparaison avec l'huile seule (Couedelo et al., 2015). Toujours chez le rat, une émulsion contenant de la PC induit une augmentation de la sécrétion de TG au niveau lymphatique en comparaison avec l'huile seule. Les auteurs montrent que ce résultat n'est pas dû à une augmentation de l'absorption intestinale de lipides et concluent donc que la PC doit avoir un impact direct sur le processus de formation des CM (Nishimukai et al., 2007). Par ailleurs, la PC d'origine biliaire a été montrée comme jouant un rôle dans la synthèse d'apoB48 (Davidson et al., 1986) et la PC exogène dans la synthèse d'apoA-I (H. Wang et al., 2001). Ces résultats suggèrent un rôle de la PC dans la formation des CM dans l'intestin. Enfin, chez l'Homme la prise d'une émulsion stabilisée avec de la lécithine d'œuf entraîne une triglycéridémie postprandiale plus élevée, associée à des concentrations plasmatiques plus importantes de CCK, glucagon-like peptide-1, et peptide YY, en comparaison avec une émulsion stabilisée avec du caséinate de sodium et des MG (Keogh et al., 2011).

2.6.2.2 Impact des lipides polaires laitiers

Concernant les lipides polaires laitiers, la SM et ses métabolites digestifs (céramide, sphingosine) sont connus pour réduire l'absorption du cholestérol comme observé en aigu chez le rat (Noh et al., 2004; Nyberg et al., 2000), chez la souris et sur des cellules Caco-2 (Eckhardt et al., 2002). Cet effet est très certainement responsable de la réduction des taux de cholestérol plasmatique et hépatique observés chez les rongeurs suite à la consommation quotidienne pendant plusieurs semaines de LP

laitiers (voir paragraphe 3.3.1). En revanche, l'impact des LP laitiers sur la triglycéridémie postprandiale n'a été que rarement étudié à ce jour.

Une étude clinique réalisée sur 18 volontaires sains, n'a pas mis en évidence d'effet des LP laitiers sur la lipémie postprandiale chez l'Homme. Dans cette étude randomisée, en simple aveugle et croisée, les volontaires ont consommé une boisson à base de babeurre contenant 2,8 g de LP laitiers dans un petit déjeuner hyper-lipidique. Après une période d'interruption, ils ont consommé une boisson contrôle contenant 2,8 g de LP d'œuf. En postprandial sur 8 heures aucune différence de TG, cholestérol total et LDL-cholestérol plasmatique n'est observée selon la boisson consommée. Seule une tendance à moins de cholestérol dans LRT à 1 h peut-être relevée avec les LP laitiers (Ohlsson, Burling, et al., 2010). Le faible nombre de volontaires ou la dose administrée de LP laitiers peuvent être des obstacles à l'observation d'un effet. De plus, aucune comparaison n'a été faite avec la lécithine de soja malgré sa pertinence commerciale.

Contredisant également les résultats obtenus chez l'animal, une étude réalisée sur 6 patients iléostomisés, montre que des doses croissantes de SM laitière administrées dans un repas n'ont pas d'effet sur l'excrétion de cholestérol dans l'iléon (Ohlsson, Hertvig, et al., 2010). En revanche, cette étude montre que la consommation de SM alimentaire induit une augmentation de l'afflux de SM et de céramide dans l'iléon. Au cumulé sur 8h, la SM retrouvée dans le contenu iléal correspond à 19% de la dose administrée, montrant que si la SM a été digérée et absorbée à 80%, la proportion non absorbée reste non négligeable. Il ne semble pas y avoir de dose-réponse ni de saturation de la capacité à digérer la SM selon la dose administrée (50, 100 et 200mg).

Une synthèse des différentes études menées sur les effets des LP laitiers sur le métabolisme lipidique postprandial est donnée dans la Table 4.

Table 4 : Etude des effets des lipides polaires laitiers sur la lipémie postprandiale chez l'animal et l'Homme.

Références	Type de LP	Groupe LP laitiers	Groupe control	Dose de LP	Modèle d'étude	Effets observés
Animal	(Nyberg et al., 2000)	SM laitière	Emulsion lipidique ratio Chol:SM de 1:1	6,5 µmoles	Rats male Sprague-Dawley	↘ absorption du Chol
	(Noh et al., 2004)	SM laitière	Emulsion lipidique + SM laitière	80 µmoles	Rats male Sprague-Dawley	↘ absorption du Chol ↘ Chol, AGNE et LP dans la lymph
Homme	(Ohlsson, Burling, et al., 2010)	Babeurre enrichi en LP laitiers	Babeurre enrichi en LP laitiers + SM d'œufs	975mg vs 119 mg de SL	18 H sains	tendance ↘ du Chol des LRT Pas d'effet sur les TG
	(Ohlsson, Hertvig, et al., 2010)	SM laitière	SM laitière + eau + lait écrémé	50, 100 et 200 mg	6 H/F iléostomisés suite à une RCH	Pour les 3 doses : Pas d'effet sur l'efflux iléal de Chol ↗ efflux iléal de SM, notamment de SM-22:0, -23:0 et -24:0

AGNE : acide gras non estérifié ; Chol : cholestérol ; LP : lipide polaire ; LRT : lipoprotéine riche en TG ; RCH : rectocolite hémorragique ; SL : sphingolipide ; SM : sphingomyéline ; TG : triglycéride.

3 Devenir métabolique des lipides et conséquences inflammatoires

3.1 Devenir des chylomicrons

Les lipides alimentaires sont transportés par les CM de l'intestin vers le foie et les tissus périphériques. Une fois qu'ils ont rejoint la circulation sanguine, les CM acquièrent rapidement des apoC-II, l'apoC-III à nouveau et l'apoE par transfert à partir des HDL. Les TG des CM sont ensuite hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). La LPL est fixée à la paroi endothéliale des capillaires sanguins des tissus utilisant les AG pour le stockage (tissu adipeux) ou pour l'énergie (cœur, muscle squelettique) par l'intermédiaire de la glycosylphosphatidyl-inositol anchored high-density lipoprotein binding protein 1 (GPIHBP1) (Beigneux et al., 2007).

L'action de la LPL est dépendante de plusieurs co-facteurs. Ainsi des études réalisées chez l'Homme montrent que l'apoCII active la LPL, tandis que l'apoCIII l'inhibe (Jong et al., 1999; Pollin et al., 2008). En plus de ces deux apolipoprotéines, la taille et le nombre des lipoprotéines riches en TG joueraient un rôle sur leur dégradation par la LPL. Ainsi, Martins et al. montrent qu'un grand nombre de CM est moins efficacement dégradé qu'un petit nombre de CM et donc qu'il s'agit d'un processus saturable (Martins et al., 1996). De plus, les gros CM sont plus rapidement éliminés que les petits (Quarfordt et al., 1966) probablement due à une affinité plus importante pour la LPL. En effet une relation inverse entre la taille des CM et la constante d'inhibition de la LPL a été observée (Xiang et al., 1999). A cet égard, un impact du type de matière grasse et de l'état émulsionné sur la taille des CM a été observé. Ainsi la consommation par des hommes sains de beurre provoque la sécrétion de petits CM, en comparaison avec de l'huile d'olive ou de tournesol qui engendrent la sécrétion de plus gros CM (Mekki et al., 2002). Chez l'obèse, l'ingestion de matière grasse émulsionnée induit au bout de 2 heures la sécrétion de CM trois fois plus gros que ceux observés suite à l'ingestion de matière grasse non émulsionnée. La cinétique de TG contenus dans les CM obtenue suite à l'ingestion de la matière grasse émulsionnée est plus rapide suggérant une hydrolyse plus rapide des gros CM (Vors et al., 2013).

L'hydrolyse des TG libère des AGL et des 2-MG qui sont captés par les différents tissus. Les CM forment des particules de plus en plus petite taille appelées « résidus » de chylomicrons. Au cours de ce processus, la dissociation des apoA et C et des LP entraînent la formation de particules HDL naissantes. Une petite partie des résidus est captée directement par les tissus périphériques mais la grande majorité est catabolisée par les hépatocytes par l'intermédiaire d'une endocytose récepteur dépendante faisant intervenir l'apoE (Gautier et al., 2010). Une fois captés par les hépatocytes, les résidus de CM internalisés subissent une lipolyse et une protéolyse.

De nouveaux lipides sont synthétisés dans le foie et à nouveau transportés vers les tissus périphériques. Ce transport est effectué par les VLDL, mais aussi par les IDL et LDL issues du catabolisme des VLDL. La synthèse de VLDL est stimulée en période postprandiale par le captage hépatique des résidus de CM et en période interprandiale ou de jeûne par la lipolyse du tissu adipeux. Les voies de synthèse et de sécrétion des VLDL au niveau du foie, sont identiques à celles décrites pour les CM dans les entérocytes. Les VDL sont donc des particules riches en TG plus petites que les CM (30 à 80 nm). A leur surface une unique apolipoprotéine constitue leur principale protéine, l'apoB100.

Une fois sécrétées dans le compartiment intravasculaire les VLDL subissent l'action de la LPL, exactement comme les CM, qui conduit à la formation des IDL. Les IDL sont à leur tour hydrolysées par la lipase hépatique et transformées en LDL. Au cours de ce processus, les lipoprotéines s'enrichissent en esters de cholestérol sous l'effet de la *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP) qui réalise des échanges équimolaires de cholestérol et de TG avec les HDL. Les IDL et LDL enrichies en cholestérol permettent son transport du foie vers les tissus périphériques (Gautier et al., 2010). Environ 50% des VLDL sécrétées par le foie sont converties en LDL. Les VLDL, IDL et les LDL sont susceptibles d'être réabsorbés par le foie à tout moment. Elles se fixent aux hépatocytes via des récepteurs cellulaires spécifiques de type LDL-R, reconnaissance de l'apoE pour les VLDL et de l'apoB100 pour les IDL et LDL, puis sont internalisées par un mécanisme d'endocytose. Il existe une troisième voie de transport des lipides qui concerne le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie *via* les lipoprotéines HDL. Cette voie nommée voie inverse du cholestérol ou voie de retour n'est pas décrite dans ce manuscrit.

Il est à noter que le métabolisme lipidique des rongeurs et des Hommes est sensiblement différent. En effet, le métabolisme lipidique des rongeurs est basé principalement sur les HDL, athéroprotectrices, tandis qu'il est basé chez l'Homme sur les LDL, athérogènes (A. J. Kennedy et al., 2010). Cette différence peut expliquer en partie la résistance des rongeurs à l'athérogenèse.

A terme les AG générés sont captés par les tissus périphériques qui s'en servent de substrat. Ils utilisent les AG soit comme source d'énergie sous forme d'ATP ou soit comme réserve lipidique sous la forme de TG. Les muscles squelettiques, le muscle cardiaque et le foie utilisent les AG à des fins énergétiques en les beta-oxydant. Les lipides sont les macronutriments les plus énergétiques avec une enthalpie molaire de 9,4 kcal/g tandis qu'elle est de 4 kcal/g pour les protéines et les glucides (Voet et al., 2005). Le tissu adipeux blanc est reconnu comme le lieu principal de stockage des lipides. Il est constitué à 75% de TG stockés dans le cytoplasme des adipocytes (Bastard et al., 2013).

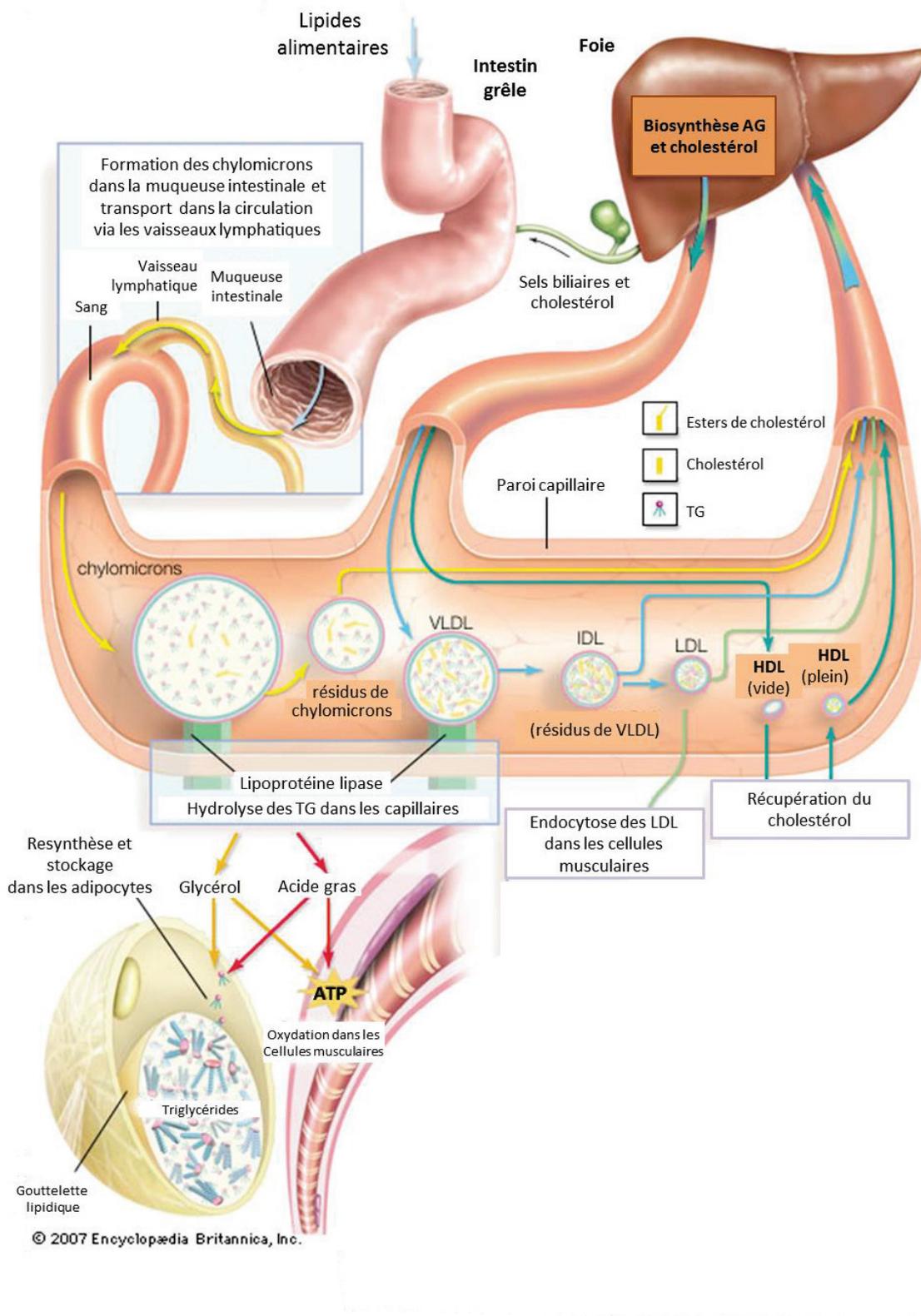


Figure 14 : Devenir métabolique des lipoprotéines. Source : adapté de (Encyclopædia Britannica Online, 2007), par courtoisie de l'Encyclopaedia Britannica, Inc., copyright 2007; utilisée avec permission.

3.2 Inflammation du tissu adipeux

Récemment, l'obésité et le diabète de type 2 ont été associés non seulement à une hypertrophie du tissu adipeux (TA) mais aussi à une inflammation chronique de bas bruit (Libby, 2002; Shoelson et al., 2007). En effet plusieurs études cliniques réalisées chez des personnes obèses montrent une augmentation modérée mais chronique de protéines impliquées dans l'inflammation telles que la protéine C-réactive (CRP) ou les cytokines IL-6 et TNF- α . En comparaison avec des individus sains, les personnes en surpoids ou obèses ont des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires et des taux faibles de cytokines anti-inflammatoires (Maury et al., 2010). Des travaux récents montrent que cette inflammation serait due au moins en partie à la production et la sécrétion par le TA de nombreux facteurs pro- et anti-inflammatoires.

Le TA a longtemps été considéré comme étant uniquement un lieu de stockage des graisses, un réservoir d'énergie. On sait désormais qu'il est aussi un organe endocrine capable de communiquer avec d'autres organes au travers de la sécrétion d'AG libres et de molécules de l'inflammation appelées adipokines. Les adipokines peuvent agir localement ou entrer dans la circulation et avoir une action systémique. L'expansion du TA est associée à une dérégulation de la sécrétion de ces adipokines conduisant à une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires (Greenberg et al., 2006; Ouchi et al., 2011).

Le TA est composé principalement d'adipocytes mais il comprend également d'autres types cellulaires nécessaires à sa croissance et son fonctionnement, incluant des pré-adipocytes, des lymphocytes, des macrophages, des fibroblastes et des cellulaires vasculaires. Des travaux réalisés d'abord dans des modèles murins (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003) puis chez l'Homme (Cancello et al., 2005; Curat et al., 2004) montrent qu'en situation d'obésité le TA est infiltré par un grand nombre de macrophages et que cette infiltration est liée à l'inflammation systémique et à l'insulino-résistance. L'accumulation des macrophages est proportionnelle à l'adiposité et une perte de poids entraîne une diminution du nombre de macrophages dans le TA liée à une diminution de l'inflammation chez des sujets obèses (Cancello et al., 2005; Weisberg et al., 2003). Si la différenciation des pré-adipocytes en macrophage semble possible, les travaux indiquent plutôt qu'ils proviendraient de la migration des monocytes circulants vers le TA, attirés par des facteurs chimio attractants, dont le facteur MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) aussi appelé CCL-2 (Kamei et al., 2006; Kanda et al., 2006). L'état inflammatoire du TA est dû à un changement de phénotype des macrophages infiltrés, du type M2 ou « activés alternativement » vers le type M1 ou « classiquement activés ». En effet, il a été montré que le TA de souris saines présente principalement des macrophages de type M2 qui produisent des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et IL-

1RA tandis que le TA de souris obèses est constitué de macrophages de type M1 sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, TNF- α et IL-1 (Lumeng et al., 2007). L'analyse de coupes de TA de personnes obèses présentant une inflammation a permis d'observer que chez ces individus, les macrophages M1 sont disposés en forme de « couronnes » autour d'adipocytes présentant des signes de mort cellulaire (Figure 15), ce qui n'est pas le cas des macrophages M2 (Cinti et al., 2005). Les adipokines proinflammatoires provenant des macrophages M1 agissent localement mais aussi à distance et constituent un lien entre le TA et les complications systémique de l'obésité (Ouchi et al., 2011; Poitou et al., 2007).

Dans les travaux portant sur l'impact métabolique des lipides alimentaires, il convient donc d'examiner la composante inflammatoire associée à l'expansion du TA.

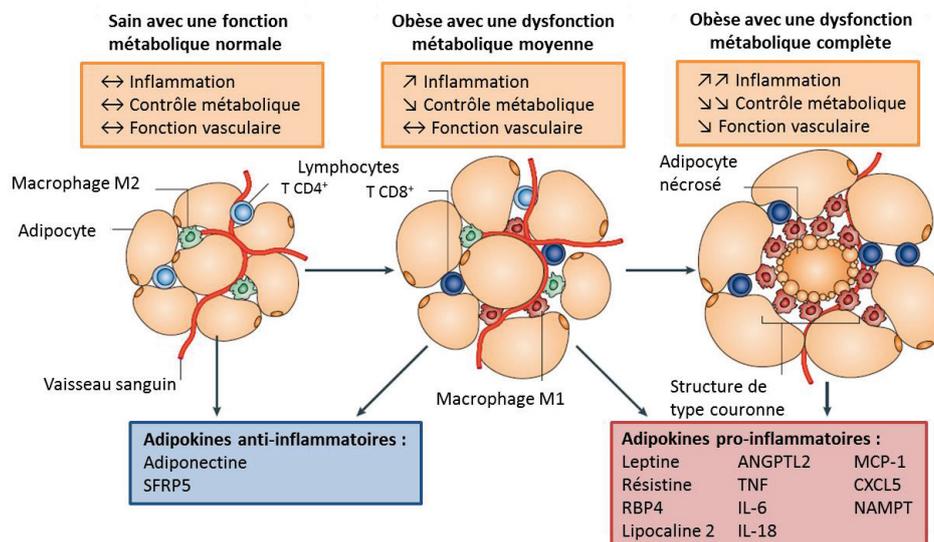


Figure 15 : Evolution du phénotype du tissu adipeux blanc. Source : adapté de (Ouchi et al., 2011)

3.2.1 Impact des lipides alimentaires sur l'inflammation du tissu adipeux

Des études chez l'animal montrent que le type de lipides constituant un régime est capable de moduler le niveau d'inflammation du TA blanc. Ainsi un régime riche en AGS ou en AGPI *n*-6 favorise une inflammation du TA (Alvheim et al., 2013; A. Kennedy et al., 2009) tandis qu'au contraire les AGPI *n*-3 protégeraient de cette inflammation (Awada et al., 2013; Buckley et al., 2009; Calder, 2006). Les AGS provoqueraient une inflammation via la voie de signalisation des récepteurs Toll-Like (TLR) auxquels ils sont capables de se lier. Ainsi, les acides gras laurique, palmitique et stéarique augmentent l'expression génique d'IL-6 dans les macrophages via la voie de signalisation du récepteur TLR4 (Shi et al., 2006). TLR-4 active les voies de l'inflammation en stimulant l'expression de facteurs de transcription, tels qu'IKK β et NF- κ B (Teng et al., 2014). Les AGS stimulent également l'inflammation par une voie indépendante du récepteur TLR4, la production de ROS (Teng et al.,

2014). Les AGPI *n*-6 peuvent se convertir en acide arachidonique qui est le substrat majeur de la production d'eicosanoïdes connus pour leur caractère pro-inflammatoire. Enfin, les AGPI *n*-3 exercent une régulation négative de la production par le TA de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , IL-6 et MCP-1. De plus, le DHA et l'EPA inhibe la voie de signalisation de TLR4 (Teng et al., 2014).

3.2.2 Passage d'endotoxines bactériennes via une altération de la barrière intestinale et inflammation

Comme vu précédemment (paragraphe 2.5.5), les lipides que nous consommons sont également capables de moduler la composition et la diversité du microbiote intestinal. La composition du microbiote influe sur ses propriétés métaboliques et donc sur la santé de l'hôte. Il a été montré que les souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal) sont protégées de l'obésité induite par un régime et ont une moindre inflammation de leur TA (Caesar et al., 2015) Ce résultat et les précédentes observations suggèrent un lien de causalité direct entre le microbiote intestinal et l'inflammation du TA. Le rôle joué par le microbiote serait dû entre autres à l'action de composés spécifiques pro-inflammatoires, appelés endotoxines.

3.2.2.1 Endotoxines et inflammation

Les endotoxines ou lipopolysaccharides (LPS) sont des composés de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif. Les LPS se composent d'une partie lipidique complexe, appelée le lipide A, et d'une partie polysaccharidique, elle-même composée d'un noyau et d'une chaîne O spécifique (Figure 16A).

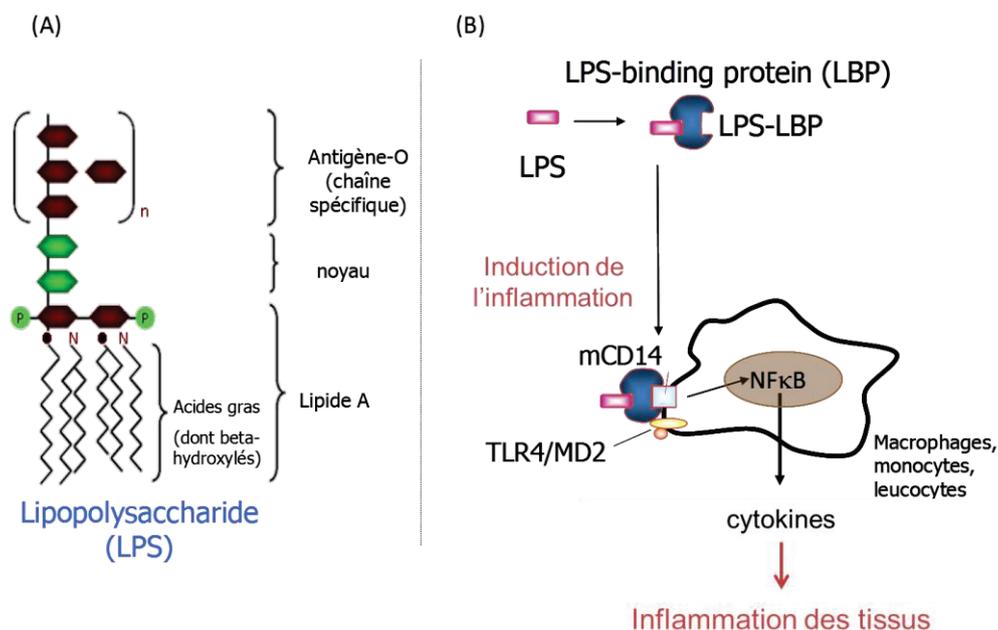


Figure 16 : Structure générale d'un lipopolysaccharide bactérien (A) et induction de l'inflammation par les LPS (B). Source : adapté de (Laugerette et al., 2011).

Durant une infection bactérienne, la concentration plasmatique en LPS, normalement faible chez les personnes en bonne santé, est augmentée et provoque la production de facteurs pro-inflammatoires (Goto et al., 1994; Marshall, 2005). En effet, une fois dans la circulation les LPS sont rapidement pris en charge par la lipopolysaccharide binding protein (LBP), une glycolipoprotéine de 65 kDa qui se lie au lipide A du LPS (P. S. Tobias et al., 1992). La LBP a longtemps été considérée comme quasi exclusivement produite par le foie, cependant très récemment Moreno et al. ont montré qu'il s'agissait également d'une adipokine sécrétée par le TA (J. Moreno-Navarrete et al., 2015; J. M. Moreno-Navarrete et al., 2013). La LBP transfère le LPS au cluster de différenciation 14 (CD14), présent dans la membrane plasmique d'un grand nombre de types cellulaires notamment les macrophages et les monocytes (Hailman et al., 1994; P. S. Tobias et al., 1992). En plus de cette forme membranaire, CD14 est également retrouvé dans une forme soluble circulante (sCD14) (Bazil et al., 1991). Les deux formes reconnaissent le complexe LPS-LBP et assurent la médiation d'un signal de transduction incluant l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B via l'activation d'un complexe comprenant le récepteur TLR4 et la myeloid differentiation protein-2 (MD2) (Kim et al., 2007). Cette cascade de signalisation conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, il a été montré que les LPS activent la polarisation des macrophages en macrophages pro-inflammatoires M1 (Martinez et al., 2008; Zheng et al., 2013). Ces mécanismes de transport et d'activation des voies inflammatoires par les LPS sont décrits depuis longtemps dans le cadre d'un choc septique, néanmoins leur implication dans l'inflammation à bas bruit associée aux maladies métaboliques est une découverte récente.

Le microbiote intestinal étant riche en bactéries Gram négatives, il constitue une source potentielle importante de LPS (Berg, 1996) mais l'établissement d'un lien concret entre le microbiote et la présence de LPS dans le plasma n'a été réalisé que très récemment. En effet, Cani et al. ont montré qu'un régime hyperlipidique de plusieurs semaines augmente la concentration plasmatique en LPS et que cette augmentation est étroitement corrélée à des modifications de la composition du microbiote intestinal, à savoir une corrélation négative entre le nombre de Bifidobactéries (Gram positives) et l'endotoxémie (Cani et al., 2007). De plus, l'administration d'antibiotiques à des souris obèses ou nourries avec un régime hyper-lipidique conduit à une modulation de leur microbiote intestinal et permet de réduire l'endotoxémie métabolique et l'inflammation à bas bruit associée ainsi que la quantité de LPS présente dans leurs fèces (Cani et al., 2008). Enfin, il a été montré que l'augmentation d'endotoxines dans le plasma suite à la prise d'un régime hyper-lipidique est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale. C'est cette perméabilité augmentée qui permettrait de passage des endotoxines du microbiote dans la circulation (Cani et al., 2008; de La Serre et al., 2010).

3.2.2.2 Altération de la barrière intestinale : rôle du gel de mucus

L'intestin constitue une barrière importante entre le milieu extérieur et l'intérieur de l'organisme. On appelle « fonction barrière », la capacité de l'épithélium intestinal à contrôler l'absorption des molécules dans l'organisme. Cette fonction barrière est assurée par plusieurs mécanismes. Premièrement, l'épithélium lui-même constitue une barrière physique. Deuxième, les jonctions serrées qui relient les cellules épithéliales, assurent la formation d'une couche continue qui permet de limiter le passage paracellulaire de molécules. Enfin la sécrétion d'un gel de mucus venant recouvrir l'épithélium constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes et les toxines qu'ils produisent. De plus, des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le gel de mucus est impliqué dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire (Chang et al., 2012; liboshi et al., 1996)

Récemment, il a été observé chez des animaux obèses et diabétiques de type 2 une couche de mucus intestinal plus mince que chez les animaux sains (Everard et al., 2013). En effet, Everard et al. montrent qu'une obésité induite chez la souris par un régime hyperlipidique se traduit par une diminution de l'épaisseur du gel de mucus dans le côlon associée à une diminution de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* dans les fèces, espèce utilisant le mucus comme source d'énergie (Derrien et al., 2004). Ces souris sont également caractérisées par une augmentation de leur concentration plasmatique en LPS, de leur adiposité et de l'inflammation du tissu adipeux. Par ailleurs en administrant la bactérie *Akkermansia muciniphila* dans le régime hyperlipidique, ils restaurent l'épaisseur du gel de mucus et les paramètres métaboliques dont l'inflammation (Everard et al., 2013). Ces observations suggèrent que le gel de mucus joue un rôle essentiel dans la fonction barrière ; l'épaisseur du gel influençant ainsi le passage de LPS et l'inflammation. Dans le même sens, une épaisseur réduite du gel de mucus associée à une augmentation de la perméabilité intestinale est observée dans des modèles de souris atteintes de colite ulcéreuse (Stremmel et al., 2013). Notre équipe a également relevé qu'un plus grand nombre de cellules à gobelet sécrétrice de mucus dans le côlon de rats était associé à une moindre adiposité et à une moindre inflammation suite à un régime hyperlipidique (Benoit et al., 2014).

3.2.2.3 Impact des lipides alimentaires sur les cellules à mucus

Les lipides résiduels atteignant le côlon peuvent impacter les cellules à gobelet et donc le gel de mucus. Ainsi l'huile de palme dans le côlon de rats et l'acide palmitique *in vitro* sur des cellules du côlon (HT29-MTX) augmentent la production de MUC2 et renforcent la barrière intestinale, en comparaison avec une huile riche en AGPI (Benoit et al., 2015).

La PC est présente dans le gel de mucus. En effet, les chaînes glucidiques des mucines négativement chargées s'attachent au groupement choline positivement chargé de la PC (Stremmel et al., 2013).

Une bicouche de PC se forme ainsi à la surface du gel de mucus, constituant une barrière supplémentaire contre le passage des bactéries du microbiote. Chez des patients atteints de rectocolique hémorragique (RCH, maladie inflammatoire de l'intestin) on observe une réduction de la quantité de PC contenue dans le mucus (Braun et al., 2009). Plusieurs études chez l'Homme montrent un effet bénéfique de l'administration orale de PC (issue du soja) sur des patients atteints de RCH. Les liens présentés ici entre les lipides alimentaires, le microbiote intestinal, le gel de mucus et l'inflammation du tissu adipeux sont schématisés dans la Figure 17.

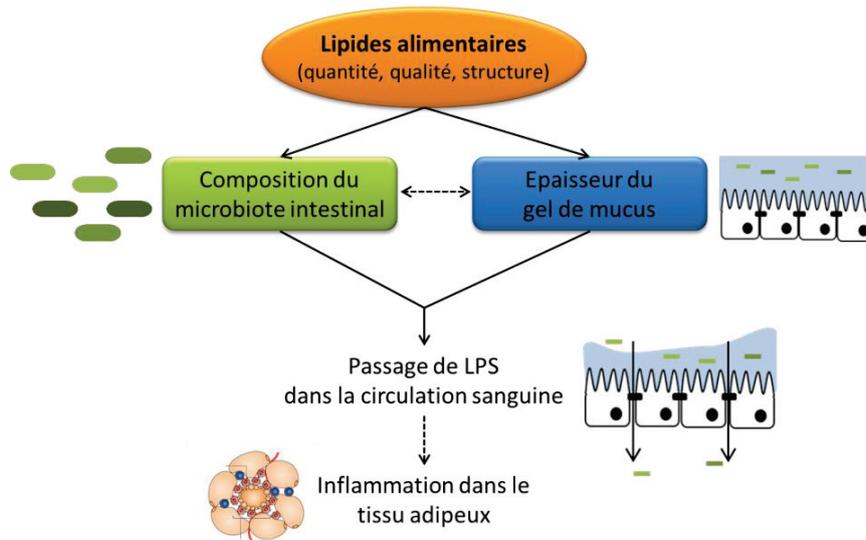


Figure 17 : Schéma de la relation entre les différents acteurs présentés dans ce manuscrit comme à l'origine de l'inflammation dans le tissu adipeux.

3.3 Effets connus des lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique, l'inflammation et la barrière intestinale

3.3.1 Impact des lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique

Concernant le métabolisme des lipides, un grand nombre d'études récentes rapportent un effet bénéfique de l'apport de LP laitiers sur le métabolisme du cholestérol et des TG, essentiellement au niveau hépatique.

3.3.1.1 Etudes animales

En effet chez la souris, l'ajout dans un régime à 21% de lipides d'un extrait de babeurre enrichi en LP laitiers (1,2% de LP laitiers) pendant 8 semaines entraîne au niveau hépatique une diminution des lipides totaux, des TG et du cholestérol et une diminution des lipides plasmatiques (TG, cholestérol total et phospholipides). Ces effets ne sont pas observés lors de l'ajout de cet extrait riche en LP laitiers dans un régime contenant 4,6% de lipides. Ce résultat suggère que les LP laitiers ont un effet

bénéfique uniquement en situation délétère : stéatose hépatique, taux de lipides élevés dans le plasma, etc. (Wat et al., 2009). Dans une seconde étude avec le même régime, les auteurs observent à nouveau au bout de 5 semaines une diminution de l'accumulation hépatique de cholestérol qui est associée à une augmentation de son excrétion fécale suggérant que les LP laitiers inhibent l'absorption du cholestérol au niveau intestinal. Une perte fécale plus importante en LP, notamment en SM (+ 580%) et en céramide (dihexosylceramide, + 1017%), est également observée (Kamili et al., 2010). Zhou et al. observent un effet hypocholestérolémiant de la MFGM chez le rat. La consommation pendant 12 semaines d'un régime à 5% de lipides supplémenté avec 2,5% de MFGM, soit 0,5% de LP laitiers, induit au niveau du foie une diminution du cholestérol estérifié et une tendance à la diminution des TG. En revanche au niveau plasmatique, ces auteurs observent une augmentation des TG (A. L. Zhou et al., 2012).

L'effet des LP laitiers sur l'absorption du cholestérol est probablement dû à leur forte teneur en SM. En effet plusieurs études ont montré une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol en présence de SM issus du lait en aigu (Noh et al., 2004; Nyberg et al., 2000) et à moyen terme (Eckhardt et al., 2002). Chez la souris, 4 jours de supplémentation avec 0,1 % de SM laitière d'un « chow-diet » à 11% de lipides, induit une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol de 20% en comparaison avec de la PC issue du jaune d'œuf (Eckhardt et al., 2002). Cet effet serait dû à la formation de complexe cholestérol-SM suite à une interaction physico-chimique forte entre la sphingosine de la SM et le cholestérol (Garmy et al., 2005).

Dans un modèle de souris obèses, la présence de 1,7 % de LP laitiers obtenus à partir de sérum de beurre dans un régime à 14% de lipides induit une diminution des TG hépatiques ainsi que du cholestérol total et du LDL-cholestérol plasmatique. Dans cette étude les auteurs ont cherché à déterminer quelle classe de LP était responsable des effets observés. Ainsi en substituant 0,5% du régime avec les céramides extraits du mélange de LP laitiers, ils obtiennent le même effet sur les lipides hépatiques et plasmatiques. En revanche aucun effet n'est observé, lorsque la substitution est faite avec la fraction SM ou PE du mélange de LP laitiers, suggérant que les effets observés seraient dû uniquement à une action des céramides (Watanabe et al., 2011). De plus, une diminution d'AG 18 :1 n-9, substrat clé de la formation des TG et LP, est également observée au niveau hépatique avec les céramides. Les auteurs soulèvent l'hypothèse que les baisses en TG et en cholestérol au niveau du foie pourraient être reliées à la régulation négative de l'expression de la Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) par les céramides. SCD1 est une enzyme qui catalyse notamment l'élongation du 18:0 en 18 :1 n-9 (Watanabe et al., 2011). Sur le même principe, Reis et al. (2013) ont nourri des souris avec un régime hyperlipidique contenant soit 1,2 % de LP laitiers soit uniquement la fraction phospholipides (0,8 %) ou la fraction sphingolipides (0,4 %) extraites de ces LP laitiers. Au niveau

hépatique, les LP totaux et les phospholipides réduisent la synthèse de novo d'AG, tandis que les sphingolipides tendent à réduire la synthèse de TG. De plus une diminution du ratio 16 :1n-7/16 :0, conduisent les auteurs à émettre également l'hypothèse que les sphingolipides laitiers diminuerait la synthèse de TG via une diminution de l'activité de SCD1 dans le foie (Reis et al., 2013).

Les résultats obtenus dans les études animales décrites ci-dessus sur l'impact des LP laitiers dans un régime sur le métabolisme lipidique sont synthétisés dans la Table 5.

L'ensemble de ces études chez les rongeurs indique qu'une supplémentation en LP laitiers dans un régime hyper-lipidique, permet de diminuer les taux de cholestérol et de TG hépatiques. Au niveau plasmatique, on observe également dans la plupart des études une diminution du cholestérol total et LDL-cholestérol, mais les résultats sont plus controversés concernant les TG. Les mécanismes envisagés sont une inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol par la SM et une diminution de la synthèse hépatique des TG par les céramides. Cependant ces résultats ne peuvent pas être transposés directement à l'Homme car il existe des différences considérables entre les rongeurs et l'Homme en terme de métabolisme lipidique hépatique et plasmatique. C'est pourquoi des études chez l'Homme sont nécessaires pour déterminer les effets des LP laitiers. Une revue des différentes études cliniques déjà publiées est réalisée ci-dessous.

Table 5 : Récapitulatif des études réalisées sur rongeur étudiant les effets de lipides polaires laitiers dans un régime sur le métabolisme lipidique.

Référence	Type de LP	Lipides dans le régime (%)	Dose de LP	Modèle d'étude	Durée	Effets observés sur	
						Le cholestérol et les lipides hépatiques	Autres
(Eckhardt et al., 2002)	SM laitière	5	0,1	Souris C57BL/6	4 j	↳ absorption du chol	-
(Wat et al., 2009)	Extrait de babeurre enrichi en LP laitiers	21 ou 4,6	1,2	Souris C57BL/6	8 s	Régime à 21% : ↳ lipides, TG, chol hépatiques ↳ chol plasmatique	↳ TG, PhL plasmatiques ↳ glycémie
(Kamili et al., 2010)	Extrait de babeurre enrichi en LP laitiers	21	1,2	Souris C57BL/6	3 et 5 s	↳ TG et PhL hépatiques ↳ absorption du chol ↳ excrétion fécale de chol, PhL et Cer	↳ excrétion fécale de PL et céramide
(Watanabe et al., 2011)	LP laitiers Fractions seules : - Cer - PE - SM	14	1,7 0,5	Modèle de souris obèse	4 s	LP laitiers : ↳ TG hépatique ↳ chol tot et LDL-chol plasmatiques Fraction Cer : ↳ TG, chol tot, 18:1n-9 16:1n-7, 18:1n-7 hépatiques ↳ chol tot plasmatique, Aucun effet des fractions PE ou SM	-
(A. L. Zhou et al., 2012)	MFGM	5	0,5	Rats fischer-344	12 s	↳ chol estérifié hépatique	↳ TG plasmatique
(Reis et al., 2013)	LP laitiers Fractions seules : - PhL - SL	26	1,2 0,8 0,4	Souris C57BL/6	10 s dont 5 s avec les LP	LP laitiers et fraction PhL : ↳ synthèse d'AG hépatique Fraction SL : ~ ↳ synthèse de TG ↳ 16:1n-7/16:0 hépatique	-

AG : acide gras ; Chol : cholestérol ; Cer : céramide ; j : jour ; LP : lipide polaire ; PE : phosphatidylethanolamine ; PhL : phospholipide ; s : semaine ; SL : sphingolipide ; SM : sphingomyéline ; TG : triglycérides ; tot : total ; ~ : tendance.

3.3.1.2 Etudes cliniques

Des résultats concernant un effet hypolipémiant chez l'Homme de la consommation de babeurre ont été obtenus récemment (Baumgartner et al., 2013; Conway et al., 2013). Ainsi, la consommation quotidienne pendant 4 semaines de 45 g de babeurre (0,6% de SM dans les lipides totaux) induit chez des personnes saines (n=34, LDL<5mM) une diminution des concentrations plasmatiques à jeun en cholestérol total (-3,1% vs placebo), LDL-cholestérol (-3,1% vs placebo) et TG (-10,7% vs placebo) dans une étude croisée réalisée avec un placebo, randomisée et en double aveugle (Conway et al., 2013). Les auteurs attribuent la diminution du cholestérol à la présence de SM qui inhiberait l'absorption du cholestérol et la baisse importante de TG plasmatiques à une réduction de synthèse de TG hépatiques par les LP laitiers comme observée chez la souris (Eckhardt et al., 2002; Reis et al., 2013). Baumgartner et al. (2013) ont étudié l'effet de la matrice alimentaire sur le métabolisme du cholestérol. Pour cela, 97 volontaires sains ont été assignés soit au groupe contrôle, ne modifiant pas son alimentation, soit au groupe consommant un œuf par jour, soit au groupe consommant un jaune d'œuf incorporé dans une boisson à base de babeurre par jour (215 mg/j de cholestérol en plus pour les femmes et 97 mg/ jour pour les hommes dans les groupes œufs vs le groupe contrôle). Chez les femmes ayant consommé un œuf par jour, on observe une augmentation du cholestérol total et du LDL-cholestérol plasmatique par rapport au groupe contrôle. Cette augmentation n'est pas observée avec le groupe consommant l'œuf associé au babeurre (Baumgartner et al., 2013). Là encore les auteurs suggèrent que cet effet hypocholestérolémiant serait dû à l'action des LP laitiers et notamment de la sphingomyéline.

Une étude réalisée sur 11 volontaires sains montrant que la consommation de babeurre de culture, dépourvu de MFGM, pendant 3 semaines n'entraîne pas de modification des lipides plasmatiques, appuie l'hypothèse que l'effet hypolipémiant observé avec le babeurre serait dû à des composés de la MFGM (Thompson et al., 1982). Plus récemment l'impact de deux produits laitiers, se distinguant par leur teneur en MFGM, sur le métabolisme lipidique de personnes en surpoids a été étudié chez l'Homme. Les volontaires (n=57) ont consommé 40g de matière grasse laitière par jour sous la forme soit de crème fouettée (contenant 19,8 g de LP laitiers) soit d'huile de beurre (contenant 1,3 g de LP laitiers) pendant 8 semaines. Si l'huile de beure entraîne une augmentation du cholestérol total et du LDL-cholestérol, la crème fouettée n'a pas cet effet et les auteurs attribuent cela à la présence de MFGM dans la crème fouettée. Cependant dans cette étude les données n'indiquent pas de différence dans l'absorption du cholestérol ou sa synthèse entre les groupes suggérant un autre mécanisme non élucidé (Rosqvist et al., 2015).

Table 6 : Récapitulatif des études cliniques étudiant les effets de la consommation de lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique.

Références	Type d'étude	Volontaires	Gp Intervention	Dose LP/ jour	Gp Control	Dose LP/ jour	Durée	Effets observés	
								Le cholestérol et les lipides hépatiques	TG plasmatique
(Ohlsson et al., 2009)	Bras parallèles	48 H/F Sains	Babeurre enrichi en LP laitiers (n=29)	2,8 g	Lait écrémé + LP d'œufs (n=19)	2,8 g	4 s	LP d'œuf : ↗ chol plasmatique LP laitiers : aucun effet	↗
(Conway et al., 2013)	Double aveugle, randomisée, essai croisé avec placebo	34 H/F LDL<5mm	Boisson avec babeurre (n=34)	184 mg	Boisson control (n=34)	35mg	4 s	↘ TG chol total, LDL- chol	↘
(Baumgartner et al., 2013)	Randomisée, Bras parallèles avec placebo	77 H/F Sains	+ 1 jaune d'œuf dans 100mL babeurre (n= 57)	Non donné	+ 1 oeuf (n=20)	Non donné	12 s	Chez les femmes Control : ↗ chol et LDL-cho Babeurre : aucun effet, prévention de la hausse du chol plasmatique	-
(Ramprasath et al., 2013)	Randomisée, Essai croisé	10 H/F Sains	Huile de maïs + SM laitière (n=10)	+ 1 g	Huile de maïs (n=10)	0 g	14 j	↗HDL-cholestérol Pas d'effet sur l'absorption et la synthèse du chol	-
(Rosqvist et al., 2015)	Simple aveugle, randomisée, Bras parallèles	46 H/F Surpoids	Crème fouettée (MFGM) (n=26)	19,8 g	Huile de beurre (n=20)	1,3 g	8 s	Control : ↗ chol et LDL-cho Crème : aucun effet	-

Chol : cholestérol ; LP : lipide polaire ; MFGM : membrane des globules gras du lait ; SM : sphingomyéline ; TG : triglycéride.

Cependant les études menées avec des LP laitiers ou de la SM ne montrent pas d'effet ni sur l'excrétion fécale et l'absorption intestinale du cholestérol ni sur les lipides plasmatiques (Ohlsson et al., 2009; Ramprasath et al., 2013). En effet, dans une étude randomisée avec bras parallèles, des volontaires sains ont consommés chaque jour pendant 4 semaines une boisson laitière contenant 2,8 g de LP soit de lécithine d'œuf soit 119 mg de SL (n = 18) ou 2,8 g de LP laitiers soit 975 mg de sphingolipides (n = 29). Les volontaires ayant consommé la boisson contenant les phospholipides d'œuf ont vu leurs lipides plasmatiques augmenter à la fin de l'intervention, effet non observé avec les LP laitiers (Ohlsson et al., 2009). Cependant aucun effet hypolipémiant des LP laitiers n'est observé dans cette étude. Cependant il faut souligner que les boissons ont été stérilisées à 143°C ce qui a pu détériorer la MFGM et la composition des boissons en LP laitiers. Enfin une supplémentation de 1 g de SM laitière par jour pendant 14 jours, induit une augmentation du HDL-cholestérol mais pas de modification de l'absorption et de la synthèse de cholestérol chez 10 volontaires sains (Ramprasath et al., 2013). Ces deux études ont pu être limitées par le faible nombre de volontaires (< à 30) et/ou par le fait que les volontaires n'avaient pas de perturbations de leur métabolisme. Des études menées sur des patients avec un syndrome métabolique, une hypercholestérolémie moyenne ou une pression artérielle élevée pourraient donner une vision plus large du potentiel bénéfique des LP laitiers ; ce sont les perspectives proposées dans plusieurs articles ou revues de littérature (Castro-Gomez et al., 2015; Conway, Gauthier, et al., 2014; Ohlsson et al., 2009).

Une synthèse de ces différentes études cliniques sur l'impact de la consommation des LP laitiers sur le métabolisme lipidique est donnée Table 6.

3.3.2 Impact des lipides polaires laitiers sur l'inflammation

Différents travaux montrent des effets anti-inflammatoires de LP laitiers dans des situations d'inflammation plus aiguë que l'inflammation métabolique.

La MFGM a été montrée comme ayant des propriétés anti-inflammatoires. En effet, des souris qui ont été nourries pendant 5 semaines avec un régime (5% de lipides) contenant 0,6 % de lipides polaires issus de la MFGM ont une réaction inflammatoire diminuée 24 heures après une injection de LPS (baisse d'IL6, IL17, MCP, IFN γ et TNF α) ainsi qu'une perméabilité intestinale augmentée, en comparaison avec des souris ayant consommé un régime à base d'huile de maïs dépourvu de LP. 48 heures après l'injection de LPS, seules les souris nourries ayant consommé le régime contenant de la MFGM ont survécu (Snow et al., 2011).

La fonction barrière de l'intestin est opérée en partie par le gel de mucus riche en phospholipides qui recouvre les cellules intestinales. Il a été montré qu'une injection de LPS compromet l'intégrité de la barrière en diminuant l'hydrophobie de l'épithélium intestinal (Dial et al., 2002) via, entre autre, une

augmentation de la sécrétions de sPLA2 qui hydrolyserait les phospholipides du mucus (Zayat et al., 2008). Dial et al. montrent que l'administration orale de PC (issus du soja) 1 heure avant une injection de LPS bloque l'augmentation de la perméabilité au niveau gastrique et iléal chez le rat, mais n'empêche pas l'augmentation plasmatique du TNF α (Dial et al., 2008). Un effet similaire peut être envisagé avec les LP laitiers qui contiennent de la PC. Stremmel et al. (2010) ont montré un effet bénéfique de la PC de soja sur la colite ulcéreuse. La PC présente dans le mucus du côlon diminue de 70% lors d'une colite ulcéreuse, maladie inflammatoire de l'intestin. Les auteurs trouvent un effet bénéfique de la supplémentation de PC chez les patients atteints de colite ulcéreuse (Stremmel et al., 2010). D'autres études rapportent des effets anti-inflammatoires de la PC de soja. Ainsi, la PC de soja inhibe l'expression de MCP-1 induite par le LPS *in vitro* dans des cellules endothéliales vasculaires humaines (Ishikado et al., 2009) et est efficace dans la réduction des réactions inflammatoires de l'arthrite rhumatoïde chez le rongeur (Eros et al., 2009; Hartmann et al., 2009). La PC ou ses produits d'oxydation pourraient être des agonistes du LPS pour le récepteur TLR4 et TLR2 (Erridge et al., 2008; Ishikado et al., 2009). Treede et al. ont également montré *in vitro* un effet inhibiteur de la PC sur la voie TNF α -NF κ B (Treede et al., 2007).

Les sphingolipides sont connus pour moduler l'inflammation. Chez la souris, l'incorporation de 0,1 % de SM laitière dans un régime permet de diminuer l'inflammation du côlon et de freiner le développement du cancer du côlon (Mazzei et al., 2011). Furuya et al. ont observé qu'une supplémentation orale en SM permettait de diminuer l'inflammation intestinale induite (par DSS, *dextran sodium sulfate*), modèle du syndrome de l'intestin irritable, chez la souris (Furuya et al., 2008). La sphingosine serait un important régulateur de l'inflammation intestinale (Cowart, 2009) et améliorerait la douleur associée à la colite (Duan, 2005). Un autre type de sphingolipide, les gangliosides laitiers réduisent l'inflammation intestinale et systémique (Park et al., 2007; Park, Suh, Thomson, et al., 2005). Leurs effets anti-inflammatoires s'exercent durant la lipémie postprandiale, au moment de leur absorption intestinale comme observé dans la lymphe et le plasma chez l'animal et *in vitro* (Ishikawa et al., 2009; Park, Suh, & Clandinin, 2005; Schnabl et al., 2009).

3.3.3 Impact des LP laitiers sur la barrière intestinale

Concernant la barrière intestinale, la SM et ses métabolites peuvent influencer la croissance cellulaire intestinale (Nilsson et al., 2006). Les métabolites de la SM, céramides et sphingosine sont connus pour inhiber la croissance cellulaire, et induire la différenciation et l'apoptose (Spiegel et al., 1996). Plusieurs études se sont intéressées au rôle de la SM alimentaire dans le renouvellement de l'épithélium intestinal dans des conditions normales ou tumorales. Chez des rats allaitants, la consommation durant 1 semaine de lait contenant 0,5 % de SM induit un plexus nerveux d'Auer Bach plus large et des cellules épithéliales avec des vacuoles uniquement à l'extrémité des villi, suggérant

une maturation de l'intestin plus rapide en comparaison avec des rats consommant du lait contenant 0,5 % de PC (Motouri et al., 2003). Chez la souris, un régime enrichi avec 0,1% de SM laitière supprime l'apparition de tumeurs malignes ainsi que de marqueurs précoces de la cancérogenèse colique (Schmelz et al., 1996). Chez des rats Fisher-344 avec des cryptes aberrantes, la consommation de MFGM permet de réduire le développement du cancer du côlon (Snow et al., 2010). Enfin, les LP laitiers ont été montrés comme protégeant les cellules de la muqueuse gastrique dans un contexte d'ulcère gastrique induit (Kivinen et al., 1992; Kivinen et al., 1995).

Hypothèses et objectifs

La revue de la littérature réalisée met en évidence un effet de la structure émulsionnée de la matière grasse sur la digestion des lipides et la lipémie postprandiale qui en résulte. Les lipides polaires (LP) sont des agents de formulation largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour la fabrication d'émulsions. Si la lécithine de soja est actuellement la source commerciale majeure de LP, composée quasi exclusivement de glycérophospholipides, une nouvelle source émerge, les LP laitiers, qui présentent un profil en LP spécifiques avec une large proportion de sphingomyéline (SM). Plusieurs études animales et cliniques ont montré un impact des LP laitiers sur le métabolisme du cholestérol et des lipides hépatiques à jeun, cependant leurs effets sur la lipémie postprandiale restent peu connus en dépit de son importance comme facteur de risque cardiovasculaire. De plus, l'effet de la présence de LP laitiers sur la digestion des lipides neutres et leur absorption par l'intestin reste encore à élucider. Par ailleurs, de récents travaux montrent qu'une altération de la fonction barrière du côlon via une dégradation du gel de mucus serait liée au développement de l'inflammation du tissu adipeux, contribuant à terme au développement de l'inflammation systémique à bas bruit caractéristique du syndrome métabolique. Un impact du type d'acide gras ingéré sur le gel de mucus a été montré, cependant l'effet des LP sur ces phénomènes reste à élucider.

Nous avons émis l'hypothèse que la présence de LP laitiers aurait un impact (i) en aigu, sur la digestion des lipides, leur absorption et la lipémie postprandiale et (ii) à long terme, sur le devenir métabolique des lipides et l'inflammation du tissu adipeux. Nous avons également supposé que l'ensemble de ces phénomènes pourraient différer selon le type de LP, issus du soja ou du lait, notamment par la présence de SM dans les LP laitiers.

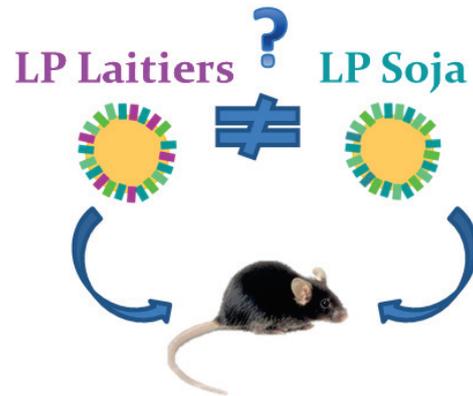
Nos objectifs ont donc été les suivants :

- identifier les effets de la présence de LP laitiers sur la digestion, l'absorption, le métabolisme postprandial des lipides,
- évaluer spécifiquement la contribution de la SM dans l'absorption des lipides, la composition et la structure des chylomicrons sécrétés par les entérocytes,
- étudier l'impact à long terme de l'apport de LP laitiers dans l'alimentation sur le métabolisme lipidique, l'adiposité et l'inflammation du tissu adipeux,
- mettre en évidence leur spécificité par rapport aux LP de soja dans l'ensemble de ces phénomènes.

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en place deux études chez la souris permettant d'étudier les effets aigus et chroniques des LP laitiers. Dans un premier temps, des souris ont été gavées avec des émulsions lipidiques stabilisées par des LP soit laitiers soit de soja et leur effets différentiels sur l'absorption intestinale et la lipémie postprandiale ont été étudiés. Parallèlement, ces deux émulsions ont été digérées *in vitro* dans un modèle de digestion humaine statique afin de caractériser l'impact du type de LP sur la lipolyse gastrique et intestinale. De plus, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, l'effet de la SM laitière sur l'absorption des lipides et la sécrétion des chylomicrons a été étudié dans un modèle de cellules entérocytaires, les cellules Caco-2/TC7. L'ensemble de ces travaux font l'objet d'un premier chapitre. D'autre part, ce travail de thèse s'inscrit en partie dans le cadre d'un grand projet transdisciplinaire financé par l'Agence Nationale de la Recherche intitulé VALOBAB (VALORisation durable du BABeurre) coordonné par ma directrice de thèse Marie-Caroline Michalski. L'un des objectifs de ce projet ANR est de mettre en évidence l'intérêt nutritionnel des LP laitiers chez l'Homme dans une perspective de valorisation du babeurre pour des applications nutritionnelles. Au cours de cette thèse, nous avons mis en place une étude clinique bi-centrique (Lyon et Clermont-Ferrand) dont l'objectif est de déterminer l'impact de la teneur en LP laitiers d'un repas sur l'absorption et le métabolisme postprandial des lipides. La méthodologie de cette étude et des résultats préliminaires seront également présentés et discutés dans ce premier chapitre comme ouverture translationnelle.

Dans un second temps, les LP laitiers et de soja ont été incorporés dans des régimes hyper-lipidiques et leurs effets à long terme sur l'expansion du tissu adipeux et son caractère inflammatoire ainsi que sur le gel de mucus ont été évalués. Cette étude fait l'objet du deuxième chapitre.

Ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec le laboratoire de Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO, Rennes), notamment pour la formulation et la digestion *in vitro* des émulsions, ainsi que l'Institut des Corps Gras (ITERG, Pessac) pour la formulation des régimes et certaines analyses lipidiques et l'Unité de Nutrition Humaine (INRA UMR 1019, Clermont-Ferrand) pour la partie clinique.



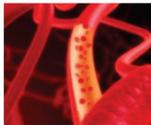
❖ Effets à court terme ?



Lipolyse (*in vitro*)

Absorption lipidique

+ Etude Caco-2/TC7



Cinétique de lipémie
- Chylomicron

+ Etude clinique
VALOBAB

❖ Effets à long terme?

Incorporation dans un régime hyperlipidique

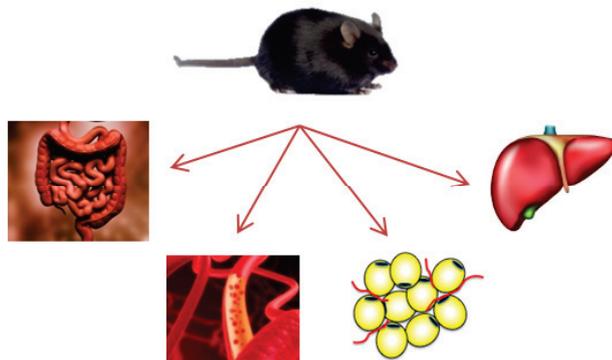


Figure 18 : Schéma résumant la problématique et les études menées au cours de la thèse.

Chapitre 1 : Impact des lipides polaires laitiers sur le métabolisme lipidique postprandial chez la souris : implication de la sphingomyéline *in vitro* et exploration modèle chez l'Homme.

Résumé du chapitre 1

Une lipémie postprandiale élevée et prolongée est désormais reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire et associée au syndrome de l'obésité (Nordestgaard et al., 2007; Zilversmit, 1995). De nombreux facteurs nutritionnels peuvent moduler l'intensité et/ou la durée de la lipémie. Parmi ceux-ci la quantité mais aussi la qualité des lipides ingérés jouent un rôle majeur (Lairon, 2008). Récemment nos travaux et ceux d'autres équipes ont montré que l'absorption des lipides et la lipémie postprandiale peuvent être modulées par la structure émulsionnée de la matière grasse ainsi que par le type d'agents émulsifiants utilisés (protéines vs LP de soja) (Couedelo et al., 2015; Keogh et al., 2011; Nishimukai et al., 2007; Vors et al., 2012; Vors et al., 2013). D'autre part, une influence importante de la structure et de la composition de la surface des émulsions sur leur susceptibilité à être hydrolysées et absorbées par l'intestin a été démontrée (Golding et al., 2010; Golding et al., 2011; M.-C. Michalski, 2009; Singh et al., 2009). Une modulation de l'hydrolyse intestinale des lipides induite par divers émulsifiants a été notamment observée (protéines vs lipides polaires de soja) (Singh et al., 2009). En revanche les effets des LP laitiers sur la digestion des lipides et la lipémie postprandiale restent à élucider. En effet, les études réalisées avec les LP laitiers ont plutôt porté jusqu'alors sur les effets à long-terme de leur incorporation dans un régime, notamment sur le métabolisme du cholestérol et des lipides hépatiques. De plus, les LP laitiers n'ont jamais été directement comparés aux LP de soja qui sont actuellement les LP les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

Dans ce chapitre, nous avons testé l'hypothèse que l'utilisation de LP laitiers comme agent émulsifiant impacterait différemment la lipémie postprandiale en comparaison avec l'utilisation de LP de soja chez la souris. Nous avons ensuite testé l'hypothèse que cette modulation de la lipémie pourrait être due à des différences d'hydrolyse digestive des émulsions en utilisant un modèle *in vitro* de digestion humaine statique. Ces expériences de digestion *in vitro* et de dosage des lipides dans le contenu intestinal des souris ont été réalisées par Claire Bourlieu et Mathilde Claude au sein du Laboratoire de Science de Technologie du Lait et l'œuf (STLO, Rennes). D'autre part, la particularité des LP laitiers étant leur richesse en SM, nous avons étudié *in vitro* l'impact de la présence de SM sur l'absorption lipidique et la sécrétion des chylomicrons par les cellules Caco-2/TC7.

Chez la souris, nos résultats ont mis en évidence qu'une émulsion lipidique stabilisée par des LP laitiers induit une cinétique de lipémie postprandiale plus rapide qu'une émulsion stabilisée par des LP de soja, avec des concentrations de TG et d'AGNE plus élevées au bout d'1 heure puis moins élevées au bout de 4 heures. Des modifications de la composition et de la taille des CM ont également été observées. Ainsi, les LP laitiers ont notamment induit à 2 et 4 heures la sécrétion de chylomicrons plus gros, connus pour être plus facilement dégradés par la lipoprotéine lipase, ce qui pourrait expliquer en partie la plus faible lipémie observée à 4 heures avec les LP laitiers. Nous avons montré que ces différences de lipémie pourraient provenir de différences de cinétique de digestion. En effet les souris nourries avec les LP laitiers présentaient 1 heure après le gavage plus de produits d'hydrolyse lipidique dans leur intestin puis moins de ces produits d'hydrolyse à 2 heures en comparaison avec les souris nourries avec des LP de soja.

De plus, nous avons montré *in vitro* des différences de lipolyse intestinale des deux émulsions. En effet, l'émulsion stabilisée avec des LP laitiers présentait une hydrolyse de ces TG plus importante lors de la phase intestinale de la digestion, suggérant un plus fort afflux d'AG et de MG disponibles pour l'absorption par les entérocytes depuis cette émulsion, ce qui pourrait expliquer la lipémie plus élevée obtenue à 1 heure chez la souris.

Enfin, l'incubation pendant 24 heures de micelles mixtes lipidiques contenant de la SM sur des cellules Caco-2/TC7 tend à induire la sécrétion par celles-ci d'une quantité plus importante de TG sous la forme de CM plus petits. Ce résultat est similaire à celui observé chez la souris 1 heure après un gavage avec l'émulsion contenant des LP laitiers suggérant que cet effet des LP laitiers serait dû, au moins en partie, à leur forte teneur en SM. Par ailleurs, l'étude du métabolisme de la SM nous a permis de confirmer la capacité des cellules Caco-2/TC-7 à métaboliser la SM laitière et à synthétiser et sécréter de nouvelles espèces moléculaires de SM.

Ces études *in vitro* et chez la souris montrent un effet différentiel des LP laitiers et de soja sur la digestion des lipides et la lipémie postprandiale et encouragent donc l'exploration chez l'Homme des effets des LP laitiers. Dans ce contexte, nous avons mis en place une étude clinique dont l'objectif est d'étudier l'ingestion de produits alimentaires réalistes enrichis en différentes doses de LP laitiers sur (i) le métabolisme postprandial des AG et du cholestérol et (ii) l'afflux de SM et de produits de lipolyse dans l'intestin. La démarche scientifique de ce protocole clinique et des résultats préliminaires sont présentés à la fin de ce chapitre.

L'ensemble de ces résultats, obtenus en exposition aigue, soulève la question des effets de la consommation quotidienne d'émulsifiants lipidiques présents dans les produits manufacturés, tels que les LP, sur le métabolisme lipidique à long terme.

1 Article

Milk polar lipids affect in vitro digestive lipolysis and postprandial lipid metabolism in mice¹⁻⁴

Manon Lecomte,^{5§} Claire Bourlieu,^{6,7§} Emmanuelle Meugnier,⁸ Armelle Penhoat,⁵
David Cheillan,^{5,9} Gaëlle Pineau,⁵ Emmanuelle Loizon,⁸ Michèle Trauchessec,⁹ Mathilde Claude,^{6,7}
Olivia Ménard,^{6,7} Alain Géloën,⁵ Fabienne Laugere,⁵ and Marie-Caroline Michalski^{5*}

⁵INRA, UMR1397, Université Lyon 1, INSERM U1060, INSA-Lyon, IMBL, CarMeN laboratory, F-69621 Villeurbanne, France; ⁶INRA, UMR 1253, Science & Technology of Milk and Egg, F-35000, Rennes, France; ⁷Agrocampus Ouest, Science & Technology of Milk and Egg, F-35000, Rennes, France; ⁸INSERM U1060, INRA UMR1397, CarMeN laboratory, F-69921 Oullins, France; ⁹Service Maladies Hérititaires du Métabolisme – Groupement Hospitalier Est – Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

[§] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: INRA, UMR1397, CarMeN laboratory, Bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE cedex, France.

Tel: +33 4 72 43 81 12 - Fax: +33 4 72 43 85 24

E-mail address: marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr.

Article publié dans *Journal of Nutrition* le 1er juillet 2015

Abstract

Background: Polar lipid (PL) emulsifiers such as milk polar lipids (MPLs) may affect digestion and subsequent lipid metabolism, but focused studies on postprandial lipemia are lacking.

Objective: We evaluated the impact of MPLs on postprandial lipemia in mice and on lipid digestion *in vitro*.

Methods: Female Swiss mice were gavaged with 150 μ L of oil-in-water emulsion stabilized with 5.7 mg of either MPLs or soybean PLs (SPLs) and sacrificed after 1, 2 or 4 h. Plasma lipids were quantified and in the small intestine, gene expression was analyzed by RT-qPCR. Emulsions were lipolyzed *in vitro* using a static human digestion model; TG disappearance was followed by TLC.

Results: In mice, after 1 h, plasma TGs tended to be higher in the MPL group than in the SPL group (141 vs 90 μ g/mL, $P = 0.07$) and nonesterified fatty acids (NEFAs) were significantly higher (64 vs 44 μ g/mL, $P < 0.05$). The opposite was observed after 4 h with lower TGs (21 vs 35 μ g/mL, $P < 0.01$) and NEFAs (20 vs 32 μ g/mL, $P < 0.01$) in the MPL group compared to the SPL group. This was associated at 4 h with a lower gene expression of *ApoB* and *Sar1b*, in the duodenum of MPL mice compared to SPL mice ($P < 0.05$). *In vitro*, TG hydrolysis was higher during the intestinal phase for the MPL compared to the SPL emulsion (decremental AUC was 1750 vs 180 %·min, $P < 0.01$). A direct impact of MPLs on enhancing lipid hydrolysis in the small intestinal lumen of mice could explain an earlier rise of intestinal lipid absorption and lipemia.

Conclusions: Postprandial lipemia in mice can be modulated by emulsifying with MPLs compared to SPLs, partly through differences in chylomicron assembly, and TG hydrolysis rate as observed *in vitro*. MPLs may thereby contribute to the long-term regulation of lipid metabolism.

Keywords: nutrition; digestion; emulsion; sphingomyelin; lipemia; food.

Abbreviations: ApoB48, apolipoprotein B48; CER: ceramide; CFU: colony-forming unit; CM: chylomicron; dAUC, decremental area under the curve; MPL: milk polar lipid; NEFA: non-esterified fatty acid; PL: polar lipid, SM: sphingomyelin; SPL: soybean polar lipid.

1.1 Introduction

It is now well recognised that postprandial hyperlipemia is an independent risk factor of cardiovascular disease and is associated with obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes [1-4]. Several factors of nutritional and pathophysiological origin can modulate postprandial lipemia. One is diet and more specifically the quantity and the quality of dietary lipids.

Dietary fat intake consists of >95 % of TGs [5, 6]. The balance consists of other lipids among which are polar lipids (PLs) including glycerophospholipids and sphingolipids. Estimates of mean dietary intakes of 2 to 8 g per day of PLs have been reported [5, 7], with the contribution of sphingolipids being approximately 200 to 400 mg per day [8, 9]. Therefore, PLs may constitute between 1-10 % of total daily fat intake [7]. From a food functionality perspective, PLs are important for their role in food texture and emulsion stability. Soybean lecithin represents 90 % of the total world PL market and is composed of glycerophospholipids. However, interest is growing for the specific properties of PLs from milk which could lead to novel ingredients. Milk polar lipids (MPLs) are components of a unique biological structure, namely the milk fat globule membrane. MPLs thus present a specific PL profile including not only glycerophospholipids, but also sphingolipids, mostly in the form of sphingomyelin (SM). In recent years, the number of reports describing their metabolic effects has increased dramatically. The reported benefits include impacts on lipid metabolism, colon cancer prevention, gut function, and gut microbiota [8, 10-13].

Regarding lipid metabolism, studies have examined the effects of MPLs on liver and cholesterol metabolism. In mice, 2 wt% of a “dairy PL-rich extract” (containing PLs as milk fat globule membrane residues), added to a 21 wt% fat diet containing 0.15 wt% cholesterol, reduced liver and plasma lipids [14]. Moreover, two articles put forward the ability of milk SM to inhibit intestinal absorption of cholesterol [15, 16]. In healthy humans, 5 week supplementation with a dairy drink enriched with 2.7 g/day of egg PLs increased circulating blood lipids, which was not observed with 2.8 g/day of MPLs in the drink [17]. Moreover, fasting plasma total cholesterol, LDL-cholesterol and TGs decreased after a daily consumption of buttermilk containing ~200 mg of MPLs during 4 weeks [18]. Most studies with MPLs have been focused on cholesterol and fasting lipid metabolism, yet less is known about their impact on postprandial lipemia despite its metabolic importance.

It has recently been revealed that human postprandial lipid metabolism can be affected by food emulsion droplet structure [6, 19]. *In vitro*, fat droplet composition (soybean PLs vs caseins) modulates enterocyte lipid absorption [20]. In rats, PLs can increase lipid absorption and postprandial lipid metabolism compared with oil devoid of emulsifier or with droplets coated with caseins [21-23]. In humans, milk fat emulsified by proteins results in enhanced lipemia and higher

beta-oxidation (i.e., lower storage) than unemulsified fat [24]. Longer term impact can be suspected, as mice pups initially fed with an infant formula including large lipid droplets coated with MPLs, compared to a control infant formula with small lipid droplets coated with proteins, were afterwards less susceptible to the deleterious metabolic effects of a high-fat diet [25, 26]. Therefore, we raise the question of the impact of MPL-coated emulsion droplets on postprandial lipid trafficking, which may result from a different digestive hydrolysis process.

Indeed the key influence of the quantity and interfacial quality of emulsions on their susceptibility to digestive hydrolysis and absorption is widely acknowledged [13, 27-29]. The surface area of an emulsion and its stability during gastric digestion were pointed out as the main physicochemical parameters affecting the rate of fat digestion because it impacts on the area available for lipase adsorption [29]. Pancreatic triglyceride lipase is highly sensitive to the quality of the surfactants present at the interface. The modulations of intestinal lipid hydrolysis induced by various emulsifiers were reported, including lecithin compared to proteins [27]. The effects of MPLs on digestive hydrolysis and subsequent postprandial lipemia were more scarcely studied and never directly compared to another natural source of PLs such as soybean PLs.

In the present study, we thus tested in mice the hypothesis that MPLs as emulsion-stabilizing agent have a different impact on postprandial plasma lipids than soybean PLs (SPLs). Using an *in vitro* digestive hydrolysis model, we further tested the hypothesis that this different impact can be due to different digestive hydrolysis.

1.2 Methods

1.2.1 Materials and emulsion preparation

SPL-rich ingredient was Lecisoya 97 lecithin provided by Novastell. MPL-rich ingredient was obtained at STLO Dairy Pilot Plant and further purified using the Folch extraction followed by two subsequent acetone extractions. The oil phase was a deodorized anhydrous milk fat olein fraction composed of TGs (Corman). Dry extract of MPL- and SPL-rich ingredients contained respectively 76.2 % and 56.8 % of PLs, the balance consisting of TGs. Detailed PL profile of both ingredients is available in Supplemental Table 1.

Two oil-in-water emulsions were prepared using the MPL-rich and the SPL-rich ingredients. MPL emulsion was made of 20 % w/v oil phase, stabilized by an additional amount of 25 % of MPL-rich ingredient w/w of the oil phase (i.e. 5 % w/v). To obtain the same TG and PL contents as in the MPL emulsion, the SPL emulsion formulation was made of 18.3 % w/v oil phase, stabilized by an additional

amount of 36 % of SPL-rich ingredient w/w of the oil phase (i.e. 6.7 % w/v). The two emulsions were thus isolipidic with the same TG concentration (21.2 g/100 mL) and the same PL concentration (3.8 g/100 mL).

Briefly, the emulsifier was dispersed in water phase by sonication 10 min, followed by 1 hour of agitation. The milk olein fraction was then heated at 100°C and dispersed in the warm aqueous phase (50°C) using a preheated ultraturrax. Emulsification was further conducted within a preheated microfluidizer (Emulsiflex C3, 20 bar, continuous mode, 30 cycles). Milk proteins (skim milk powder, Lactalis) were then added to reach a final concentration of 0.5 % w/w. The emulsions were pasteurized (72°C, 2 min) and stored at 4°C. The microbial stability over one week was checked (total aerobic mesophilic flora <100 UFC/mL).

Emulsion particle size distribution after production and during *in vitro* digestion was measured by laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern Instruments) ; diameter and specific surface area of fat droplets were calculated by the apparatus software [30].

1.2.2 Animals

All the animal experiments were carried out in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Vertebrate Animals in Research and Training and the French Ministère de l'Agriculture (no. 87-848 completed by no. 2001-464) and EU Council Directive for the Care and Use of Laboratory Animals (no. 2010/63/EU). The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of INSA-Lyon and registered under the number N°CETIL 012014. Female Swiss mice from Janvier SA were housed in a temperature-controlled room (22°C) with 12 h light/12 h dark cycles.

On the experimental day, after overnight fasting, mice weighing 33-40 g were randomly assigned to an experimental group (n=7 per group i.e. per postprandial time per type of emulsion). Each group received by oral gavage 150 µL of one of the two above-described emulsions formulated using 5.7 mg of MPLs or SPLs and was euthanized at 1h, or 2h, or 4 h after gavage (different mice were euthanized at each time point meaning that data at each time point correspond to a different group of mice). Another group of mice was euthanized immediately after gavage with water for the baseline control. For euthanizing, mice were anesthetized by IP injection of pentobarbital (35 mg/kg), and blood was collected by cardiac puncture with heparinized syringes. Plasma was collected by centrifugation (2000 g, 5 min, 4°C). The small intestine lumen was washed with PBS, the corresponding effluents comprising the small intestinal content were collected and the duodenum and jejunum mucosa were collected. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

1.2.3 Plasma lipid measurements

Plasma TG concentration was determined by colorimetric method (Triglyceride PAP 150 kit, *BioMérieux*). Plasma NEFA concentration was measured using NEFA-C kit (Wako Chemicals) as described previously [31].

1.2.4 Quantification of apolipoprotein B48 in plasma

Total proteins from plasma of mice were quantified using the Bradford protein assay (Sigma). Apolipoprotein B48 and transferrin proteins were quantified by Western blotting [32] using antibodies from Abcam. The optical density of the protein bands was visualised using the 'Image System' (ImageMaster VDS-CL, Amersham Biosciences) and densitometrically analyzed using the Quantity One image analysis software (Bio-Rad Laboratory). Densities were normalized according to both transferrin and a unique control sample.

1.2.5 Chylomicron collection and analysis

To collect the chylomicron (CM) fraction, 250 μ L of freshly collected plasma was deposited below a layer of 850 μ L deionized water and centrifuged for 4 h at 16000 g at 4°C. The floating layer containing CMs was collected and fraction volume measured. The hydrodynamic diameter of CM particles at 1 h, 2 h and 4 h was measured by dynamic light scattering at 25°C with a ZetaSizer NanoS (Malvern Instruments) using 1.0658 cP and 1.33 as viscosity and refractive index of the aqueous phase, respectively. CM fractions were stored at -80°C until biochemical analysis.

Ceramides (CERs) and SM analysis in CMs was performed by ESI-MS/MS. Briefly, CERs and SM were extracted from CMs according to the method by Kirklund [33] in the presence of internal standards (C17:0-Ceramide and C16:0D31SM, Avanti Polar Lipids) and isolated by saponification. Thereafter, sphingolipids were fractionated and desalted using reverse-phase Bond Elut C18 columns. The dry extracts were homogenized and analyzed by direct flow injection on a triple-quadrupole mass spectrometer (API 3200 MS/MS; Sciex Applied Biosystems) in the positive ionization mode using the multiple reactions monitoring method. The concentration of each molecular species was calculated from the ratio of its signal to that of the corresponding internal standard. Total CER and SM concentrations were the sum of the concentrations of the various species. Normalized concentrations were calculated according to plasma TG concentration.

1.2.6 Gene expression in the small intestine

Total RNA was extracted from duodenum and jejunum of mice with the TRI Reagent (Ambion/Applied Biosystems). RNA concentration was measured with Nanodrop ND1000 (Labtech). One microgram of RNA was used for target genes expression using RT-qPCR as already described [20]. The list of the PCR primers used is available in Supplemental Table 3.

1.2.7 *In vitro* emulsion hydrolysis.

Static *in vitro* digestion of the emulsion was conducted according to the harmonized COST COST FA 1005 Infogest protocol with minor modifications [34]. These modifications consisted in the addition of gastric lipase analogue and phospholipase A₂ [35, 36] to be more physiologically relevant of human lipid digestion [37]. The digestion consisted in two successive phases: a gastric phase of 60 minutes (pH 3), and a subsequent intestinal phase of 60 minutes (pH 7). Enzymes used in the gastric phase (expressed in U/ml in the digestive compartment) were: porcine pepsin (P6887, Sigma) 2000 U/ml and a fungic lipase analogue to Human gastric lipase (Lipase A Amano 12, Amano enzyme Europe) at 25 U/ml. In the intestinal phase, porcine pancreatin (8USP P7545, Sigma) at 100 U/ml bringing 40 U/mg of annex lipase activity, porcine pancreatic lipase (L3126, Sigma) at 2000 U/mL, porcine PLA2 (00299, Fluka) at 5 U/mL and bovine bile salt at 10 mM (B3883, Sigma) were added. At 15, 60 minutes of the gastric phase and 5, 15, 30 and 60 minutes of the intestinal phase aliquots were withdrawn. The digestions were conducted at least in triplicates for each kind of matrices.

1.2.8 Lipid analysis in lipolysis media and intestinal contents

Intestinal contents were weighed and lyophilized (RP2V, Sérail) and compared after drying. Intestinal contents and *in vitro* digestas were extracted using Folch method and analyzed by TLC as previously described [38, 39] to determine their lipid class composition: TGs, FFAs, monoglycerides and phospholipids (MGs+PLs), diglycerides and cholesterol (DGs+CO). The spots were analyzed to determine their relative intensity per lipid class by densitometry using Image scanner III (GE Healthcare Europe GmbH).

1.2.9 Statistical analysis

Data analyses were performed by using GraphPad Prism software (GraphPad). Comparison were made between groups of normally distributed data by using a two-way ANOVA (Emulsifier x Time). When the interaction term was not significant, this analysis was followed by a Bonferroni post-hoc multiple comparisons test to account for familywise error rate. If the interaction term was significant an unpaired two-tailed Student's *t*-test was performed at each time point to determine differences between MPL and SPL group (Figure 1, 2, 3 and 4 and Table 1). A one-way ANOVA according to time was performed within MPL and SPL group followed by a Bonferroni post-hoc multiple comparisons test. In Figure 2 and Figure 3, differences between two time points within MPL or SPL group were analyzed by using an unpaired two-tailed Student's *t*-test. For sphingolipid content in plasma CMs at 1 hour, MPL and SPL group were also compared by using an unpaired two-tailed Student's *t*-test (Table 2). Normality of data was examined using the Kolmogorov-Smirnov test; all data follow a normal distribution. Variance homogeneity was examined by using an *F*-test. When the variances between groups were unequal, the data were transformed to logarithms before analysis. Log

transformed variables were then back-transformed for graphical representation, i.e. for plasma lipids (TGs, NEFAs) in Figure 1, and MGs+PLs and Lipids in Figure 3. From *in vitro* digestion data (Figure 4), the trapezoidal rule was used to calculate the decremental area under the curve (dAUC) of residual TGs of the gastric phase (0-60 min) and of the intestinal phase (60-120 min), using as baseline the y -values at 0 min and at 60 min, respectively. Differences were considered significant at the $P < 0.05$ level, whereas differences in which $0.05 < P < 0.1$ were considered tendencies. All data are presented as means \pm SEMs.

1.3 Results

1.3.1 Lipid composition of the two emulsions

MPL-rich ingredient contained a sizeable content of SM (leading to 1.1 wt% SM in MPL emulsion) while SPL-rich ingredient was devoid of SM and PS and contained more PC and PI compared to the MPL-rich ingredient (Supplemental Table 1). Emulsion FA profiles were standard for milk fat emulsions (Supplemental Table 2). However, MPL emulsion contained a higher proportion of short- and medium-chain FAs and of 20:0 and (n-3) VLC-PUFA. SPL emulsion had a high content of linoleic acid (18:2(n-6)). In order to avoid possible confounding effects due to different initial fat interface areas on lipid hydrolysis, both emulsions were specifically prepared to present similar initial specific surface of the oil phase of 17 m²/g (Supplemental Table 4).

1.3.2 Postprandial lipemia during emulsion digestion in mice

Regarding plasma TG concentration (**Figure 19A**), an interaction was observed between postprandial time and PL type. Both MPL-fed and SPL-fed mice had higher plasma TG concentration at 1 h than at 2 h and 4 h. At 1 h, the plasma TG concentration in MPL group tended to be 60% higher than in SPL group ($P = 0.07$). However at 4 h, it was lower in MPL group than in SPL group ($P < 0.01$). The same effects were observed for the plasma NEFA concentration with an interaction between postprandial time and PL type (**Figure 19B**). In MPL-fed and SPL-fed mice, plasma NEFA concentration was higher at 1 h than at 2 h and 4 h. MPL group had a higher plasma NEFA concentration than SPL group at 1 h ($P < 0.01$), and a lower one at 4 h ($P < 0.01$). Of note, estimated AUCs of plasma TGs and NEFAs were similar regardless of emulsifier (data not shown).

A time effect was observed regarding plasma apolipoprotein B48 (ApoB48). In MPL-fed mice, a lower plasma level of ApoB48 was observed at 4 h than at 1 h ($P < 0.01$; **Figure 19C**). Conversely in SPL-fed mice, no variation of ApoB48 concentration was observed over time.

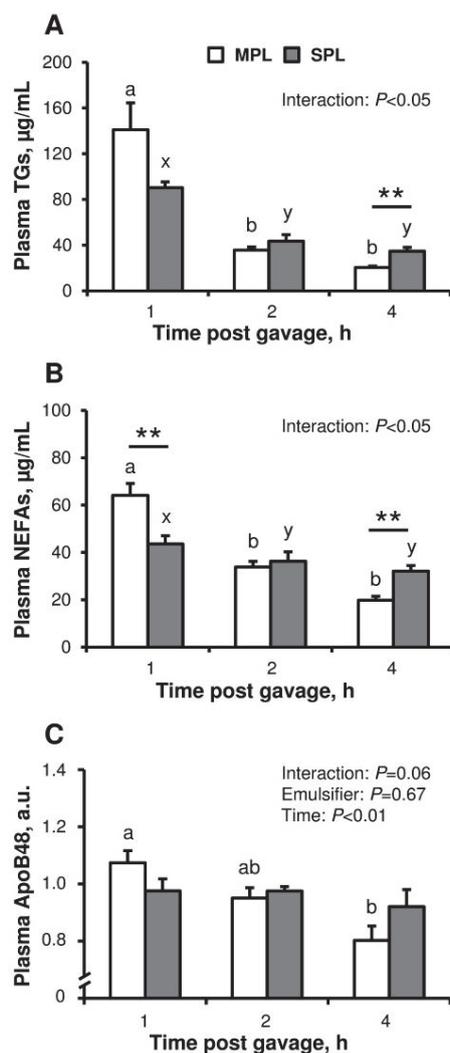


Figure 19 : Plasma lipid concentrations and apoB48 levels in mice after oral administration of emulsions stabilized with MPLs or SPLs. (A) Plasma TG concentration, $n=5$. (B) Plasma NEFA concentration, $n=6$. (C) Plasma apoB48 levels obtained by Western blot with densities normalized according to transferrin and to a unique control sample, $n=6$. (A-B-C) Bars represent means \pm SEMs. Two-way ANOVA (Emulsifier, Time and Interaction) followed by Bonferonni post-hoc tests. When the interaction term was significant, the P values for main effects were not indicated. Asterisks indicate different from SPL emulsion at that time: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Labelled means without a common letter differ; (a, b, c) in MPL group and (x, y, z) in SPL group. ApoB48, apolipoprotein B48; MPL, milk polar lipid group; NEFA, non-esterified fatty acid; SPL, soybean polar lipid group.

Regarding CM hydrodynamic diameter, an interaction was observed between postprandial time and PL type. In MPL groups, CMs were larger at 2 h and at 4 h than at 1 h (**Table 7**; $P < 0.05$). On the contrary in SPL groups, CMs were smaller at 2 h and at 4 h than at 1 h ($P < 0.05$). At 2 h and at 4 h, CMs were significantly larger in MPL groups than in SPL groups ($P < 0.01$).

Table 7 : Hydrodynamic diameter of chylomicrons after the gavage of mice with MPL or SPL emulsion.¹

Hydrodynamic diameter, nm			
	1 h	2 h	4 h
MPL	103 ± 7 ^{a*}	328 ± 78 ^{b**}	314 ± 60 ^{b**}
SPL	128 ± 9 ^x	93 ± 10 ^y	82 ± 4 ^y

¹ Data are means ± SEM, n = 5-7. Labelled means without a common letter differ; (a, b, c) in MPL group and (x, y, z) in SPL group. Asterisks indicate different from SPL emulsion at that time: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

MPL, milk polar lipid group; SPL, soybean polar lipid group.

Among sphingolipids in CMs at 1 h, the concentration of SM was twice higher in MPL group than in SPL group (**Table 8**; $P < 0.001$) while total CERs were similar in both groups. However at 1 h, the proportion of nervonic ceramide (24:1-CER) was higher in CMs of MPL group compared to SPL group (**Table 8**; $P < 0.05$).

Table 8 : Sphingolipid content in plasma chylomicrons 1 h after the gavage of mice with MPL or SPL emulsion.¹

	MPL	SPL
SM, nmol/mg of TGs²	67.4 ± 5.5 ^{**}	33.9 ± 3.8
CERs, nmol/mg of TGs	79.2 ± 13.2	72.7 ± 18.1
24:1-CER, mol%	18.2 ± 2.3 [*]	10.4 ± 1.6

¹ Data are means ± SEMs, n = 6. Asterisks indicate different from SPL emulsion: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. CER, ceramide; MPL, milk polar lipid group; SPL, soybean polar lipid group; SM, sphingomyelin.

² Sphingolipid content is normalized by plasma TGs.

1.3.3 Gene expression of lipid metabolism-related proteins in the small intestine.

In the duodenal mucosa the expression of *Apob*, involved in CM structure, was lower at 4 h in MPL group than in SPL group (**Figure 20A**; $P < 0.05$). Moreover, the expression in this tissue of *Sar1b*, known to facilitate the formation of the pre-CMs and their fusion with the Golgi, was higher at 4 h than at 1 h in SPL-fed mice (**Figure 20B**; $P < 0.01$) while no variation was observed over time in MPL-fed mice. There was no significant difference of gene expression in the duodenum among groups regarding the fatty transporters (*Cd36*, *Fabp2*) and the protein allowing TG accretion in CMs, MTTP (results not shown). However in the jejunal mucosa, MTTP mRNA expression at 1 h was higher in MPL group than in SPL group (**Figure 20C**; $P < 0.01$).

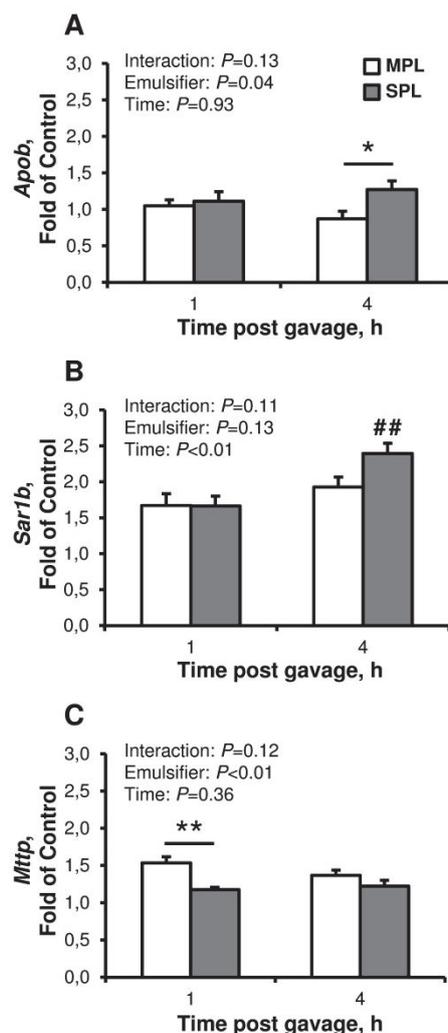


Figure 20 : mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in small intestine of mice after oral administration of emulsions stabilized with MPLs or SPLs. Apob (A) and Sar1b (B) were quantified by RT-qPCR in the duodenum and Mttp in the jejunum (C) at 1 h and 4 h after gavage. Bars represent means \pm SEMs, $n=7$. Values are normalized to the levels of Tbp mRNA and expressed as relative amount compared with control mice. Control mice were euthanized immediately after gavage with water. Asterisks indicate different from SPL emulsion at that time: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Hashtags indicate different from 1 h in that group: # $\#P < 0.01$. Apob, apolipoprotein B; MPL, milk polar lipid group; Mttp, microsomal triglyceride transfer protein; Sar1b, SAR1 gene homolog B; SPL, soybean polar lipid group; Tbp, TATA-binding protein.

1.3.4 Lipid composition of the small intestinal contents

Gut contents (dry extracts after lyophilisation) at 1 h tended to be higher in MPL group than in SPL group (27.6 ± 3.5 vs 23.1 ± 2.0 mg; $P = 0.1$). Conversely, at 2 h, gut contents were lower in MPL group than in SPL group (15.5 ± 1.9 vs 26.4 ± 1.7 mg; $P < 0.001$). Altogether, this indicates that the MPL emulsion has been digested and absorbed faster than the SPL emulsion. To focus on lipid class composition, without being biased by individual-dependent intestinal emptying or absorption, the quantity of each lipid species was normalized by gut content dry matter.

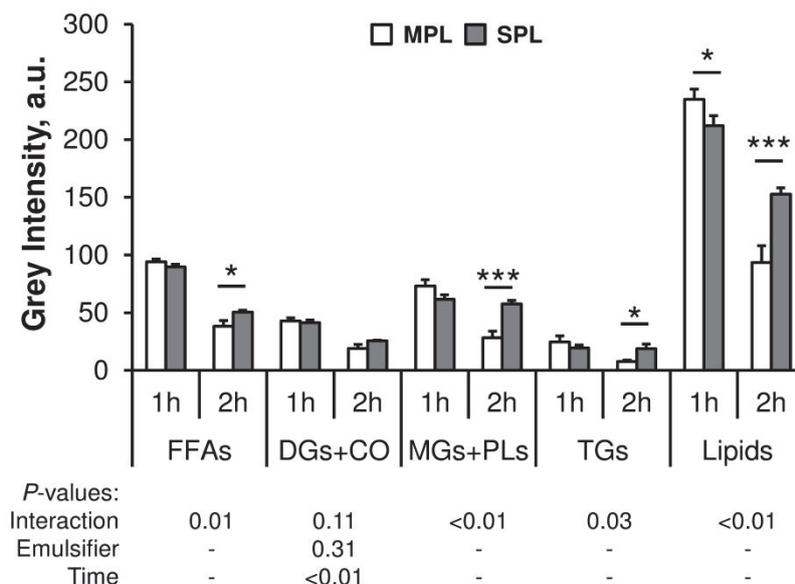


Figure 21 : Lipid classes in the mice gut contents at 1 h and 2 h after oral administration of emulsions stabilized with MPLs or SPLs. This analysis was performed by TLC. Bars represent means \pm SEMs, $n=7$. Values are normalized by the dry matter of the individual content. Two-way ANOVA (Emulsifier, Time and Interaction) followed by Bonferonni post-hoc tests. When the interaction term was significant, the P-values for main effects were not relevant and thus indicated with the symbol “-”. Asterisks indicate different from SPL emulsion at that time: * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. DGs+CO, diglycerides and cholesterol; FFAs, free fatty acids; Lipids, total lipids; MGs+PLs, monoglycerides and phospholipids; MPL, milk polar lipid group; SPL, soybean polar lipid group.

In all lipid species except for DGs+CO, an interaction was observed between time of digestion and PL type. In MPL-fed mice, all lipid species were higher at 1 h than at 2 h (**Figure 21**; $P < 0.05$). In SPL-fed mice, FFAs, DGs+CO and total lipids were higher at 1 h than at 2 h (**Figure 21**; $P < 0.05$) while MGs+PLs and residual TGs were similar at 1 h and 2 h. At 1 h, total lipids were higher in MPL group than in SPL group ($P = 0.05$) and FFAs and MGs+PLs tended to be higher in MPL group than in SPL group ($P = 0.1$ and $P = 0.06$ respectively). At 2 h, total lipids were lower in the MPL group compared to the SPL group ($P < 0.001$) with lower amounts of residual TGs ($P < 0.01$) and of FFAs, MGs+PLs and DGs+CO ($P < 0.05$).

Therefore, we further investigated *in vitro* whether these effects could be due to differences in TG digestive hydrolysis.

1.3.5 Kinetics of emulsion TG hydrolysis *in vitro*.

In the gastric phase, for both emulsions there were less residual TGs at 15 min and 60 min than at 0 min (**Figure 22**). During this phase, there was no effect of the type of emulsifier on emulsion

hydrolysis. The calculated gastric dAUCs (0-60 min) were similar regardless of emulsifier (2030 ± 217 %·min in MPL emulsion vs 2900 ± 685 %·min in SPL emulsion, $P=0.18$).

During the intestinal phase, the type of emulsifier had an effect on emulsion hydrolysis. Intestinal dAUC (60-120 min) was higher in MPL emulsion compared to SPL emulsion (1750 ± 308 %·min vs 180 ± 229 %·min, respectively; $P = 0.01$), showing an overall higher extent of intestinal TG hydrolysis. Of note, acid aggregation of fat droplets was observed in both emulsions during the gastric phase, though with smaller aggregates in the MPL emulsion compared to the SPL emulsion (Supplemental Figure 1).

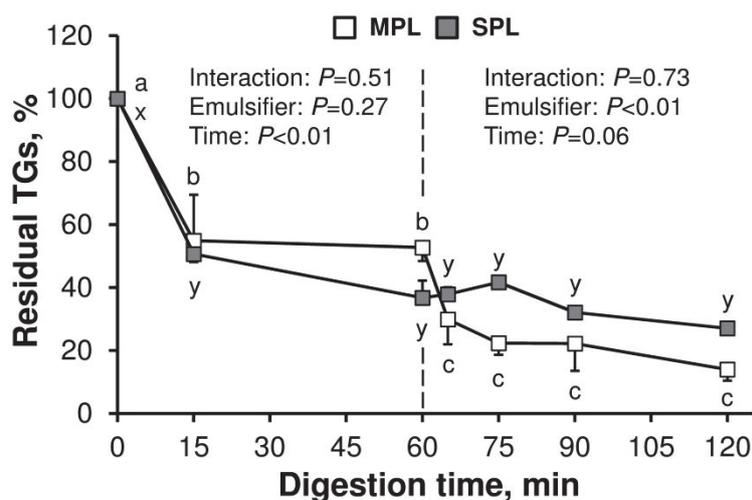


Figure 22 : Kinetics of TG hydrolysis in the MPL or SPL emulsion in an in vitro static digestion system. The digestion consisted in two successive phases: a gastric phase (0-60 min, pH 3), and a subsequent intestinal phase (60-120 min, pH 7). Separation between gastric and intestinal phase is shown by a vertical dotted black line. Bars represent means \pm SEMs, $n=3-5$. Labelled means without a common letter differ; (a, b, c) in MPL group and (x, y, z) in SPL group. MPL, milk polar lipid emulsion; SPL, soybean polar lipid emulsion.

1.4 Discussion

We show in mice that an emulsion stabilized by MPLs results in more rapid postprandial lipemia than an emulsion stabilized by SPLs, with an early increase in lipemia and a faster clearance. To date, one study in humans compared test drinks containing either milk PLs or egg PLs and reported no significant difference of postprandial TG increase after a high-fat breakfast [40]. Also, 20 g of MPLs consumed with a test meal induce lower CM-TGs in plasma after 4 h than the meal devoid of MPLs [41]. This effect appears consistent with our results, where lipemia was lower in MPL group than in SPL group after 4 h.

Moreover, we show that differences in lipemia can originate from differential kinetics of lipid hydrolysis in the mouse gut. Indeed, MPL-fed mice presented higher plasma TGs and NEFAs at 1 h than SPL-fed mice parallel with a trend towards (i) higher intestinal dry matter and (ii) higher lipid hydrolysis products in this dry matter. Then at 2 h, lipolysis products in the small intestine were lower in MPL-fed mice compared to SPL-fed mice. Intestinal content represents the difference between influx from gut emptying and outflux due to absorption. Therefore, gastric emptying and intestinal absorption may have occurred faster for MPL- than for SPL-fed mice.

We showed *in vitro* that the latter could be due to differences in digestive lipolysis due to emulsion interface composition and structure. MPL emulsion was less sensitive to gastric aggregation, which is known to be modulated by emulsifiers [29]. Of note, emulsion gastric stability/instability is an important factor controlling gastric emptying via hormonal feedback [42]. Moreover, MPL emulsion presented similar gastric lipolysis as SPL emulsion despite the development of a larger interfacial surface. This can be explained by the high concentration of SM of the MPL-rich ingredient, as a previous study reported that emulsion droplets entirely covered with SM were less susceptible to hydrolysis by the gastric lipase than using glycerophospholipids [43]. Of note, mice present only traces of gastric lipase activity (with high lingual lipolysis instead) while gastric lipolysis is an important step in human digestion [5]. In the intestinal phase, relevant both in humans and mice, aggregation was only partially reversed and both emulsions presented a broad range of particle sizes. MPL emulsion presented a 10-fold higher dAUC of intestinal TG hydrolysis compared to SPL emulsion. This result appears in agreement with previous works showing an enhancing effect of the preliminary hydrolysis of native milk fat globules (genuine MPL interface of the milk fat globule membrane) on pancreatic lipase adsorption and activity [44-46].

Altogether, the digestive processing of MPL and SPL emulsions leads to different postprandial TG concentrations in plasma. Importantly, we show that PL type modifies the amount, structure and composition of CMs, which are features of metabolic importance regarding the regulation and impact of postprandial lipemia [24, 47, 48]. The plasma concentration of ApoB48 is recognized to give an accurate measure of CM number [49]. In SPL-fed mice, we observed no variation of ApoB48 level over time, i.e. similar number of CMs. However, plasma TG concentration was lower at 4 h than at 1 h, which was associated with a decrease of CM size over time in this group. This effect is consistent with a report in humans showing that lecithin induces the production of smaller CMs than oil [50]. In contrast in MPL group, the lower lipemia at 4 h corresponds to a lower number of large CMs. Interestingly, digestive hydrolysis of CERs was reported to result in the production of large CMs

in rodents [51]. MPL emulsion contained SM, which subsequently generates CERs in the gut during digestion [9]. Therefore, the larger CMs observed in the plasma of MPL-fed mice at 2 h and 4 h could be due to such an effect of SM-derived CERs, which would deserve further investigation. Such observed variations in CM size can be of functional importance in postprandial lipemia because for a similar amount of TGs, large CMs would be cleared faster from plasma than small CMs [52, 53]. Consequently, the lower plasma TG concentration at 2 h and 4 h in MPL-fed mice compared to SPL-fed mice can be partly explained by a higher clearance of their large CMs.

However, lipemia at a given postprandial time point results from the balance between CMs synthesis and clearance. In this respect, the higher lipemia at 1 h in MPL group compared to SPL group appears consistent with the higher *Mtpp* expression in the jejunum of MPL-fed mice, because it codes for an enzyme implicated in the accretion of TGs in the pre-CM particle in the enterocytes [54]. At 4 h, the lower gene expression of *Apob* and *Sar1b* in MPL-fed mice indicates that their lower lipemia parameters are partly associated with a reduced synthesis and intracellular trafficking of CMs. Altogether, this suggests that (i) the kinetics of CM synthesis was faster in MPL than in SPL group, (ii) large CMs production from 2 h onwards could have enhanced their clearance, and (iii) the secretion of CMs was ending at 4 h for MPL-fed mice.

Regarding CM composition, early MPL-derived CMs were found to contain more SM than SPL-derived CMs, on an equal TG basis. Importantly, it is known that dietary SM, e.g. from MPLs, is not absorbed as the intact molecule. Moreover, the incorporation of CERs derived from SM in the gut into lymph SM was found negligible [9, 55]. Therefore, it appears unlikely that higher SM concentration in MPL-derived CMs would result from intact ingested SM or CERs. However, using radiolabelled tracers in sphingolipid-fed rats, authors concluded that the sphingosine formed during SM digestion in the gut might increase the formation of lymph SM [55]. Such a minor contribution of sphingosine supply in the small intestine during the digestion of MPLs on SM content in CMs cannot be ruled out in our study and would deserve further investigation.

In turn, CERs were present in similar concentrations in CMs in both groups. However, CERs in MPL-derived CMs presented a higher proportion of the nervonic species (24:1). This 24:1-ceramide would potentially prevent metabolic syndrome [56] while being inversely correlated with insulin sensitivity [57]. Therefore, our results encourage further investigation of the structure and composition of CMs according to the type of dietary emulsifier.

Interestingly regarding the further metabolic impact of emulsified structure, the use of SPLs as emulsifier was shown to enhance FA beta-oxidation in rats compared to caseins [22]. Moreover in humans, protein-based emulsion enhances dietary FA beta-oxidation compared with unemulsified

milkfat, partly due to an early postprandial rise of plasma NEFAs [24]. Here MPL-fed mice presented a higher and faster postprandial peak of plasma NEFAs. Therefore, whether MPLs could result in higher FA beta-oxidation, i.e. lower storage in the body, should be the subject of further research.

These postprandial data can provide new insight to further understand previous results obtained with MPL-enriched diets in rodents and humans. In mice, incorporation of SM and CERs or MPLs in the diet for 2 to 8 weeks resulted in lower fasting plasma TGs [14, 58]. In humans, daily consumption of an MPL-enriched emulsion during 4 weeks was reported to prevent increase in plasma TGs compared with an egg-PL formula [17]. Moreover, a daily consumption of 50 mL of buttermilk was recently shown to lower fasting plasma TGs compared with a placebo drink with traces of PLs [18]. According to the present study, we raise the hypothesis that a faster dynamics and clearance of postprandial lipemia using MPLs may contribute to lower fasting lipemia in the long term. This should be tested in new clinical studies.

In summary, we demonstrate that postprandial lipemia can be significantly modulated by using MPLs compared with SPLs as emulsifier, partly due to a different lipolytic fate in the gut, gene regulations in the small intestine and CM properties (Supplemental Figure 2). The practical relevance of this animal study should thus not be underrated. This study supports the further exploration in humans of the postprandial and long-term metabolic impact of MPLs compared to SPLs in a context of nutritional management of metabolic diseases through food formulation. Research should be conducted to understand how the specific biochemical composition and physico-chemical structure of MPLs induce the observed acute effects on lipemia. These results in the postprandial phase raise the question of whether daily ingestion of different lipid emulsifiers in manufactured foods and emulsions would result in different lipid metabolism, adiposity and/or cardiovascular risk markers in the long term.

Acknowledgements

Frédéric Gaucheron, Benoît Robert, Jean-Yves Gassi, Nadine Lecomte and Eric Baucher (Dairy Platform of STLO, INRA-Agrocampus Rennes, France) are acknowledged for providing the dairy product for MPL extraction. We thank Florent Joffre (ITERG, Pessac, France) for useful discussions about polar lipid analysis and Patricia Daira (Functional Lipidomics Plaform of IMBL, Villeurbanne, France) for her help in fatty acid analyses. We thank Corinne Malpuech-Brugère (Unité de Nutrition Humaine, INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France), Agnès Girard-Egrot (IMBL, Villeurbanne, France), Béatrice Morio and Sybil Charrière (CarMeN, Villeurbanne, France) for critical discussions on the results. Robert E. Ward (Utah State University, Logan, USA) is acknowledged for revising the English language and for useful comments on the manuscript.

Supplemental Table 1 : Polar lipid profile of the MPL- and SPL-rich ingredients used to formulate the emulsions.¹

PL classes, % total PL	MPL	SPL
SM	29.9 ± 0.5	0.0 ± 0.0
PC	21.5 ± 0.3	39.3 ± 0.3
PE	28.6 ± 0.3	24.6 ± 0.6
PS	11.6 ± 0.3	0.0 ± 0.0
PI	8.4 ± 0.3	36.1 ± 0.9

¹Data are means ± SEMs, n=3. MPL, milk polar lipid-rich ingredient; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PL, polar lipid; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin; SPL, soybean polar lipid-rich ingredient.

Supplemental Table 2 : Levels of the main fatty acids ($\geq 0.5\%$) in emulsions stabilized with MPLs or SPLs. ¹

FA, %	MPL	SPL
4:0	1.0 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1
6:0	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0
8:0	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0
10:0	2.0 \pm 0.1	1.7 \pm 0.0
12:0	2.9 \pm 0.0	2.5 \pm 0.0
14:0	10.3 \pm 0.0	9.1 \pm 0.0
14:1(n-9)	1.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0
15:0	1.1 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
16:0	32.0 \pm 0.4	32.2 \pm 0.1
16:1(n-7)	2.2 \pm 0.0	1.8 \pm 0.0
17:0	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
18:0	11.4 \pm 0.3	9.8 \pm 0.0
18:1(n-6) to (n-12) <i>trans</i>	0.4 \pm 0.3	0.5 \pm 0.0
18:1(n-7) <i>trans</i>	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
18:1(n-8) <i>trans</i>	1.1 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1
18:1(n-9)	26.7 \pm 0.9	23.6 \pm 0.0
18:2(n-6)	0.2 \pm 0.0	8.4 \pm 0.0
18:3(n-6)	1.2 \pm 1.3	0.1 \pm 0.0
18:3(n-3)	0.3 \pm 0.2	0.9 \pm 0.0
21:0	0.1 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0
Short Chain (<9 carbons)	2.7 \pm 0.1	2.1 \pm 0.0
Medium Chain (9-14 carbons)	16.4 \pm 0.0	14.2 \pm 0.0
Long Chain (15-20 carbons)	80.3 \pm 0.2	82.4 \pm 0.0
Very Long Chain (>20 carbons)	0.8 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0
SFAs	63.9 \pm 0.1	60.3 \pm 0.0
UFAs	36.1 \pm 0.2	39.7 \pm 0.0
MUFAs	32.7 \pm 0.2	29.0 \pm 0.0
PUFAs	3.3 \pm 0.1	10.7 \pm 0.0
Total (n-6) FAs	2.2 \pm 0.2	9.1 \pm 0.0
Total (n-3) FAs	0.8 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0
(n-6)/(n-3) FAs ratio	2.7 \pm 0.2	8.0 \pm 0.0

¹ Data are means \pm SEMs, n=3. FA, fatty acids; LC, long chain fatty acids, MC, medium chain fatty acids; MPL, milk polar lipid emulsion; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; SCFAs, short chain fatty acids; SFAs, saturated fatty acids; SPL, soybean polar lipid emulsion; UFAs, unsaturated fatty acids; VLC-FAs, very long chain fatty acids.

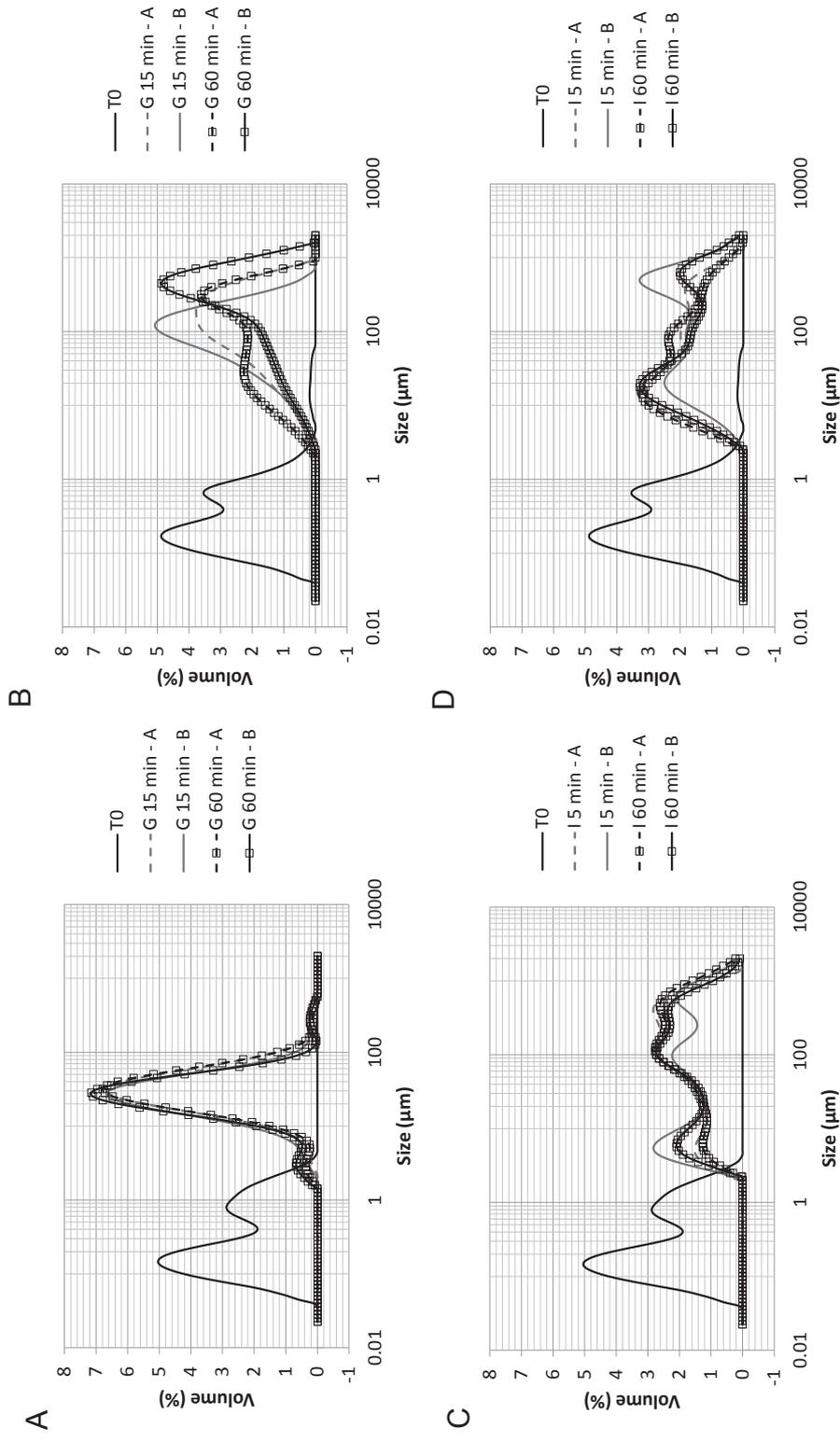
Supplemental Table 3 : GenBank accession numbers and primer sequences used in RT-qPCR experiments.

Gene	Sens (5'-3')	Anti-sens (3'-5')	Gene number
<i>Apob</i>	CCTCTCCTGGGTGTTCTAGAC	GTTTCTCCAGATCCTTGCAC	NM_009693
<i>Mttp</i>	GGAGAAGTAACCTGAACATC	ACAGGTCTGAGCTGAACATC	NM_008642
<i>Sar1b</i>	ATTGCTGGCATGACGTTTAC	TGCCATTGATAGCAGGAAGG	NM_025535
<i>Cd36</i>	GTCCTGGCTGTGTTTGGAGG	AAGATCCAAAAGTGTCTGTA	NM_001159558
<i>Fabp2</i>	ACCTCTCGGACAGCAATCAG	CTTCCCTACAGTCTAGCAG	NM_007980

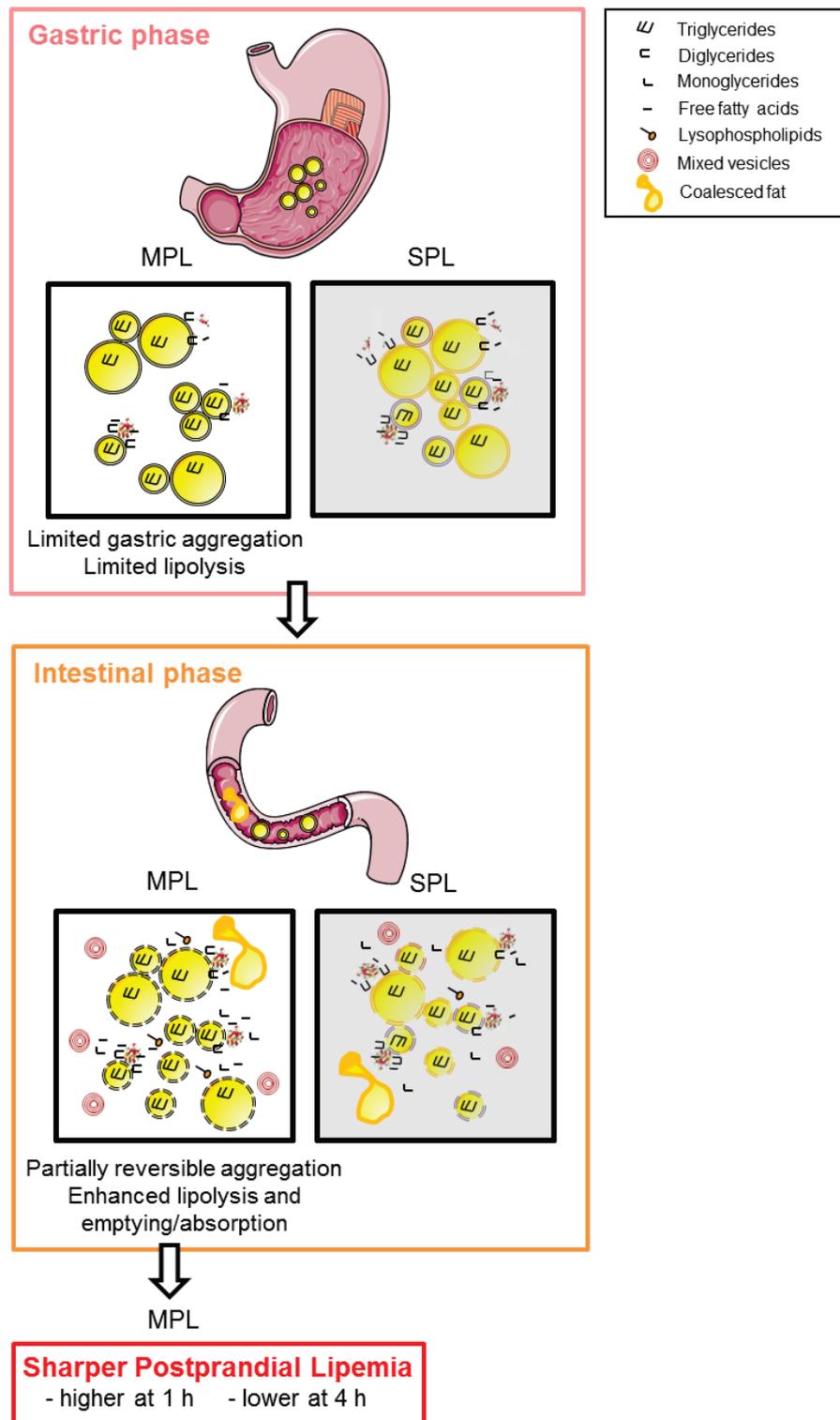
Supplemental Table 4 : Particle size distribution in emulsions stabilized with MPLs or SPLs the day following production (d1) or after 7 days storage at 4°C (d7).¹

Emulsions	D [3, 2] - Surface weighed mean, μm	D [4, 3] - Volume weighed mean, μm	Specific surface area, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ lipid
MPL d1	0.3	4.3	21.3
MPL + SDS d1	0.4	1.9	17.0
SPL d1	0.3	1.0	23.4
SPL + SDS d1	0.4	0.7	16.7
MPL d7	0.3	3.1	19.4
MPL + SDS d7	0.4	2.3	16.4
SPL d7	0.3	2.1	19.0
SPL + SDS d7	0.4	1.9	15.4

¹ Measurements were conducted in duplicate in water or in the presence of dispersing agent to dissociate hydrophobic aggregate (SDS: sodium dodecyl sulfate). d1, the day following production; d7, after 7 days of storage. D [3, 2], surface-weighted average; D [4, 3], volume-weighted average. MPL, milk polar lipid emulsion; SPL, soybean polar lipid emulsion. Specific surface area was calculated as $6 \cdot \phi / D [3, 2]$ (ϕ being the oil volume fraction).



Supplemental Figure 1. Evolution of particle size profile during *in vitro* digestion of MPL and SPL emulsions. Results are obtained during the gastric phase for MPL (A) and SPL emulsion (B) and during intestinal phase for MPL (C) and SPL emulsion (D). I, intestinal; G, gastric; MPL, milk polar lipid emulsion; SPL, soybean polar lipid emulsion; T0, initial time



Supplemental Figure 2. Summary of the observed effects of the MPL emulsion on lipolysis and postprandial lipemia compared to the SPL emulsion. MPL, milk polar lipid emulsion; SPL, soybean polar lipid emulsion.

References

- [1] Zilversmit, D. B., Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clinical Chemistry* 1995, *41*, 153-158.
- [2] Nordestgaard, B. G., Benn, M., Schnohr, P., Tybjaerg-Hansen, A., Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2007, *298*, 299-308.
- [3] Klop, B., Elte, J. W. F., Cabezas, M. C., Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* 2013, *5*, 1218-1240.
- [4] Boren, J., Matikainen, N., Adiels, M., Taskinen, M. R., Postprandial hypertriglyceridemia as a coronary risk factor. *Clinica Chimica Acta* 2014, *431*, 131-142.
- [5] Mu, H. L., Hoy, C. E., The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 2004, *43*, 105-133.
- [6] Michalski, M. C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., *et al.*, Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* 2013, *52*, 354-373.
- [7] Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W. S., Tandy, S., Dietary Phospholipids and Intestinal Cholesterol Absorption. *Nutrients* 2010, *2*, 116-127.
- [8] Vesper, H., Schmelz, E. M., Nikolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., *et al.*, Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Journal of Nutrition* 1999, *129*, 1239-1250.
- [9] Duan, R. D., Nilsson, A., Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Progress in Lipid Research* 2009, *48*, 62-72.
- [10] Spitsberg, V. L., Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science* 2005, *88*, 2289-2294.
- [11] Ward, R. E., German, J. B., Corredig, M., in: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*, Springer US 2006, pp. 213-244.
- [12] Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., *et al.*, Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal* 2008, *18*, 436-457.
- [13] Michalski, M. C., Specific molecular and colloidal structures of milk fat affecting lipolysis, absorption and postprandial lipemia. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2009, *111*, 413-431.
- [14] Wat, E., Tandy, S., Kapera, E., Kamili, A., *et al.*, Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 2009, *205*, 144-150.
- [15] Noh, S. K., Koo, S. I., Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *Journal of Nutrition* 2004, *134*, 2611-2616.
- [16] Ramprasath, V. R., Jones, P. J. H., Buckley, D. D., Woollett, L. A., Heubi, J. E., Effect of dietary sphingomyelin on absorption and fractional synthetic rate of cholesterol and serum lipid profile in humans. *Lipids in Health and Disease* 2013, *12*.
- [17] Ohlsson, L., Burling, H., Nilsson, A., Long term effects on human plasma lipoproteins of a formulation enriched in butter milk polar lipid. *Lipids in Health and Disease* 2009, *8*.
- [18] Conway, V., Couture, P., Richard, C., Gauthier, S. F., *et al.*, Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2013, *23*, 1255-1262.

- [19] Keogh, J. B., Wooster, T. J., Golding, M., Day, L., *et al.*, Slowly and Rapidly Digested Fat Emulsions Are Equally Satiating but Their Triglycerides Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *Journal of Nutrition* 2011, *141*, 809-815.
- [20] Vors, C., Capolino, P., Guerin, C., Meugnier, E., *et al.*, Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food & Function* 2012, *3*, 537-546.
- [21] Nishimukai, M., Hara, H., Aoyama, Y., Enteral administration of soyabean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *British Journal of Nutrition* 2003, *90*, 565-571.
- [22] Michalski, M. C., Briard, V., Desage, M., Geloën, A., The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat - A (CO₂)-C-13 breath test study. *European Journal of Nutrition* 2005, *44*, 436-444.
- [23] Couedelo, L., Amara, S., Lecomte, M., Meunier, E., *et al.*, Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. *Food & Function* 2015.
- [24] Vors, C., Pineau, G., Gabert, L., Drai, J., *et al.*, Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 2013, *97*, 23-36.
- [25] Oosting, A., Kegler, D., Wopereis, H. J., Teller, I. C., *et al.*, Size and phospholipid coating of lipid droplets in the diet of young mice modify body fat accumulation in adulthood. *Pediatric Research* 2012, *72*, 362-369.
- [26] Oosting, A., van Vlies, N., Kegler, D., Schipper, L., *et al.*, Effect of dietary lipid structure in early postnatal life on mouse adipose tissue development and function in adulthood. *British Journal of Nutrition* 2014, *111*, 215-226.
- [27] Singh, H., Ye, A. Q., Horne, D., Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research* 2009, *48*, 92-100.
- [28] Golding, M., Wooster, T. J., The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2010, *15*, 90-101.
- [29] Golding, M., Wooster, T. J., Day, L., Xu, M., *et al.*, Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter* 2011, *7*, 3513-3523.
- [30] Michalski, M. C., Cariou, R., Michel, F., Garnier, C., Native vs. damaged milk fat globules: Membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. *Journal of Dairy Science* 2002, *85*, 2451-2461.
- [31] Lefils, J., Geloën, A., Vidal, H., Lagarde, M., Bernoud-Hubac, N., Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *British Journal of Nutrition* 2010, *104*, 1304-1312.
- [32] Benoit, B., Plaisancie, P., Geloën, A., Estienne, M., *et al.*, Pasture v. standard dairy cream in high-fat diet-fed mice: improved metabolic outcomes and stronger intestinal barrier. *British Journal of Nutrition* 2014, *112*, 520-535.
- [33] Kyrklund, T., Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using prepacked reversed-phase columns. *Lipids* 1987, *22*, 274-277.
- [34] Minekus, M., Almgier, M., Alvito, P., Ballance, S., *et al.*, A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function* 2014, *5*, 1113-1124.
- [35] Borgstrom, B., Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A₂, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes. *Gastroenterology* 1980, *78*, 954-962.
- [36] Borgström, B., Patton, J. S., *Comprehensive Physiology*, John Wiley & Sons, Inc. 2010.

- [37] Bakala N'Goma, J. C., Amara, S., Dridi, K., Jannin, V., Carriere, F., Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Ther Deliv* 2012, 3, 105-124.
- [38] Bourlieu, C., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Madec, M. N., Bouhallab, S., Hydrolysis of native milk fat globules by microbial lipases: Mechanisms and modulation of interfacial quality. *Food Research International* 2012, 49, 533-544.
- [39] Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasnerie, A., Sams, L., *et al.*, The structure of infant formulas modulates the lipolysis, the proteolysis and the disintegration of the matrices during in vitro gastric digestion. *Food Chemistry* 2014, *In press*.
- [40] Ohlsson, L., Burling, H., Duan, R. D., Nilsson, A., Effects of a sphingolipid-enriched dairy formulation on postprandial lipid concentrations. *European journal of clinical nutrition* 2010, 64, 1344-1349.
- [41] Lund, A. P., Tholstrup, T., The nutritional importance of milk phospholipids. *Maelkeritidende* 2004, 117, 11-16.
- [42] Marciani, L., Wickham, M., Wright, J., Bush, D., *et al.*, Magnetic resonance imaging (MRI) insights into how fat emulsion stability alters gastric emptying. *Gastroenterology* 2003, 124, A581-A581.
- [43] Armand, M., Milk fat digestibility. *Sciences Des Aliments* 2008, 28, 84-98.
- [44] Berton, A., Rouvellac, S., Robert, B., Rousseau, F., *et al.*, Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their in vitro digestion by the human pancreatic lipase: Native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids* 2012, 29, 123-134.
- [45] Gallier, S., Cui, J., Olson, T. D., Rutherford, S. M., *et al.*, In vivo digestion of bovine milk fat globules: Effect of processing and interfacial structural changes. I. Gastric digestion. *Food Chemistry* 2013, 141, 3273-3281.
- [46] Gallier, S., Zhu, X. Q., Rutherford, S. M., Ye, A. Q., *et al.*, In vivo digestion of bovine milk fat globules: Effect of processing and interfacial structural changes. II. Upper digestive tract digestion. *Food Chemistry* 2013, 141, 3215-3223.
- [47] Mekki, N., Charbonnier, M., Borel, P., Leonardi, J., *et al.*, Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men. *Journal of Nutrition* 2002, 132, 3642-3649.
- [48] Niot, I., Poirier, H., Tran, T. T. T., Besnard, P., Intestinal absorption of long-chain fatty acids: Evidence and uncertainties. *Progress in Lipid Research* 2009, 48, 101-115.
- [49] Young, S. G., Recent progress in understanding apolipoprotein-B. *Circulation* 1990, 82, 1574-1594.
- [50] Beil, F. U., Grundy, S. M., Studies on plasma-lipoproteins during absorption of exogenous lecithin in man. *Journal of Lipid Research* 1980, 21, 525-536.
- [51] Kirby, R. J., Zheng, S. Q., Tso, P., Howles, P. N., Hui, D. Y., Bile salt-stimulated carboxyl ester lipase influences lipoprotein assembly and secretion in intestine - A process mediated via ceramide hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 4104-4109.
- [52] Chajek-Shaul, T., Eisenberg, S., Oschry, Y., Olivecrona, T., Metabolic heterogeneity of post-lipolysis rat mesenteric lymph small chylomicrons produced in vitro. *J Lipid Res* 1983, 24, 831-840.
- [53] Martins, I. J., Mortimer, B. C., Miller, J., Redgrave, T. G., Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *Journal of Lipid Research* 1996, 37, 2696-2705.
- [54] Gleeson, A., Anderton, K., Owens, D., Bennett, A., *et al.*, The Role of microsomal triglyceride transfer protein and dietary cholesterol in chylomicron production in diabetes. *Diabetologia* 1999, 42, 944-948.

- [55] Nilsson, A., Metabolism of sphingomyelin in intestinal tract of rat. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1968, *164*, 575-8.
- [56] Yamazaki, Y., Kondo, K., Maeba, R., Nishimukai, M., *et al.*, The Proportion of Nervonic Acid in Serum Lipids is Associated with Serum Plasmalogen Levels and Metabolic Syndrome. *Journal of Oleo Science* 2014, *63*, 527-537.
- [57] Haus, J. M., Kashyap, S. R., Kasumov, T., Zhang, R. L., *et al.*, Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 2009, *58*, 337-343.
- [58] Imaizumi, K., Tominaga, A., Sato, M., Sugano, M., Effects of dietary sphingolipids on levels of serum and liver lipids in rats. *Nutrition Research* 1992, *12*, 543-548.

2 Effet de la sphingomyéline sur le métabolisme lipidique des cellules Caco-2/TC7

2.1 Objectifs

Parmi les hypothèses pouvant expliquer l'effet des LP laitiers sur l'absorption des lipides et la lipémie postprandiale chez la souris, un possible impact direct ou indirect de la présence de SM, en proportion importante dans les LP laitiers, a été suggéré.

Il a été montré que la SM laitière diminuait l'absorption du cholestérol au niveau intestinal *in vitro* (Feng et al., 2010) et chez la souris (Noh et al., 2004; Nyberg et al., 2000). Cet effet inhibiteur est attribué à la forte interaction physico-chimique entre les molécules de cholestérol et de sphingomyéline (Eckhardt et al., 2002). Par ailleurs, la SM est une molécule active qui est décrite comme ayant des effets bénéfiques chez la souris sur la prévention du cancer du côlon (Schmelz et al., 1996) et l'amélioration de la fonction barrière de la peau (Haruta-Ono et al., 2012).

Nous avons donc voulu tester l'impact spécifique de la SM laitière sur l'absorption des lipides et la sécrétion des chylomicrons *in vitro* afin de déterminer si les effets observés *in vivo* pourraient être dus, au moins en partie, à la forte teneur en SM des LP laitiers. Pour cela des micelles mixtes lipidiques, dont les compositions en lipides se rapprochent de celles décrites pour des micelles au niveau duodénal, et enrichies ou non en SM, ont été incubées sur des cellules Caco-2/TC7, modèle de cellules entérocytaires (Figure 23).

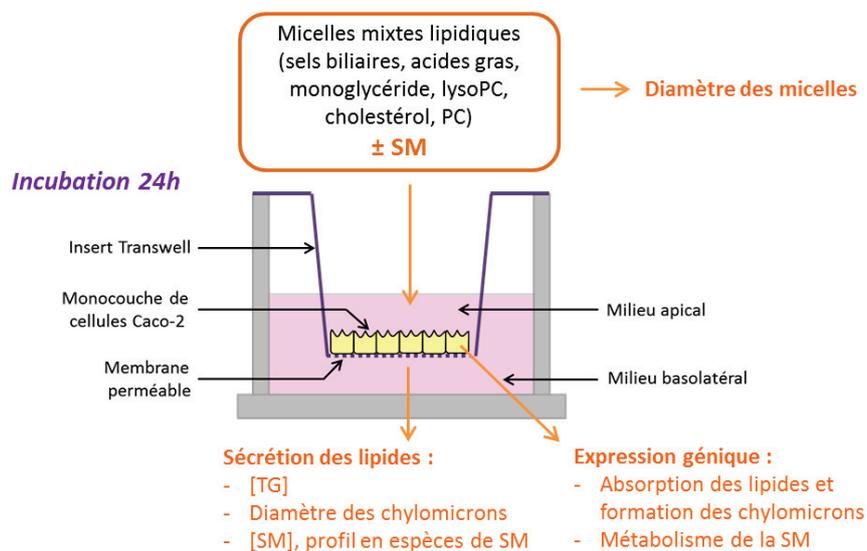


Figure 23 : Schéma du protocole de l'étude *in vitro* des effets de la sphingomyéline sur le métabolisme lipidique des cellules intestinales.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Les cellules TC7, clone de cellules sélectionnées à partir de la lignée parentale Caco-2 et gracieusement fournies par Monique Rousset (Chantret, Rodolosse et al. 1994), ont été maintenues et cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified eagle's Meduim, Gibco) additionné de 20% (Vol/Vol) de sérum de veau foetal décomplémenté, de 1 % de pénicilline /streptomycine et de 1 % d'acides aminés non essentiels (appelé ici milieu complet). Les cellules ont étéensemencées dans une flasque plastique de 75 cm² à une densité de 1x10⁶ cellules/flasque. Elles ont été incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 10 % de CO₂. Des repiquages ont été réalisés à l'aide d'une solution de trypsine 0,05 % EDTA (Gibco), deux fois par semaine lorsque les cellules atteignaient 80 % de confluence.

Pour les expériences, les cellules ont étéensemencées à une densité de 2,5x10⁵ cellules dans 1,5 ml par insert d'une plaque 6 puits en transwells (Corning, 12 mm de diamètre et 0,4 µm de porosité) pour séparer les deux compartiments, apical et basal, pendant les 21 jours de culture. Jusqu'à la confluence (J6-J7 après l'ensemencement) le milieu complet était mis en apical (1,5 mL) et en basolatéral (2mL) et à partir de la confluence, le milieu ajouté en apical était appauvri en sérum de veau foetal jusqu'à leur totale différenciation (soit 21 jours après leur ensemencement en Transwell).

2.2.2 Incubation des Caco-2/TC7 avec des micelles mixtes lipidiques enrichies ou non en SM

Avant chaque expérience d'incubation, les cellules ont été mises à jeun pendant 16 h avec du milieu DMEM sans rouge phénol et sans sérum dans les deux compartiments. Le jour de l'expérience, le milieu de culture a été enlevé et les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS puis les cellules ont été incubées avec les différentes solutions de micelles mixtes lipidiques en apical (1,5 mL) et 2 mL de milieu sans rouge phénol et sans sérum en basal. Après incubation pendant 24 h, les milieux basolatéraux ont été collectés et stockés à -80°C. Les tapis cellulaires ont également été récupérés, après rinçage, dans 1 mL de PBS et centrifugés (10 min, 4 °C, 13000 rpm). Les surnageants ont été retirés et les culots ont été stockés immédiatement à -80°C.

2.2.2.1 Préparation des micelles lipidiques

Les lipides ont été ajoutés au milieu apical sous forme de micelles mixtes lipidiques dont les compositions en lipides sont décrites comme étant similaires à celles des micelles au niveau duodénal (Chateau et al., 2005). Le mélange d'ingrédients nécessaires à la formation des micelles a été préparé de manière à obtenir comme concentration finale dans le milieu de culture d'incubation : 0,5 mM d'acide oléique ; 0,2 mM de 2-oleoylglycérol ; 0,2 mM de lysophosphatidylcholine ; 0,05

mM de cholestérol ; 2 mM de taurocholate et 0,4 mM de phosphatidylcholine (adapté de (Salvini et al., 2002)) sans ou avec 0,4 mM de sphingomyéline (SM issue du lait de vache, Réf. 860063C, Avanti Polar Lipids). Le mélange de lipides a été ensuite évaporé sous azote et congelé à -20°C. Le jour même de la manipulation, le milieu de culture DMEM sans rouge phénol et sans sérum chauffé à 37°C a été ajouté aux culots lipidiques congelés, puis vortexé pendant 5 minutes. Les micelles lipidiques ont alors été produites en plongeant les tubes dans un bain à ultrasons jusqu'à obtention d'un aspect limpide. Les milieux de culture avec micelles ont été conservés à 37°C jusqu'à incubation sur les cellules Caco-2/TC7.

2.2.3 Mesure de la résistivité trans-épithéliale TEER

La perméabilité de la monocouche cellulaire a été testée grâce à la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) qui est le reflet fonctionnel du degré de cohésion entre les cellules ; celui-ci est élevé si les cellules sont jointives. Le principe est de mesurer au moyen d'un résistivimètre (Millicell ERS-2) la résistance au passage d'un faible courant électrique au travers du filtre microporeux sur lequel poussent les cellules. Le résistivimètre est constitué de deux électrodes : une longue plongeant dans le milieu basolatéral au fond du puits et une autre plus courte placée au niveau du milieu supérieur apical. Le courant passe entre les deux électrodes et l'on mesure la résistance au passage du courant en ohms par insert. La mesure de la TEER a été réalisée avant et après l'incubation afin de s'assurer de l'intégrité de la monocouche cellulaire au cours de la manipulation. La chute de la TEER ne doit pas dépasser 20% de la TEER initiale pour considérer la monocouche cellulaire comme toujours intègre.

2.2.4 Dosage des triglycérides dans le milieu basolatéral

Les TG ont été quantifiés à l'aide d'un kit de quantification spécifique pour son seuil de détection sensible (BioVision, CliniSciences, France) en suivant les instructions du fournisseur. Les TG ont été clivés par une lipase pour libérer le glycérol et les AG. Les molécules de glycérol ont été oxydées par un mélange d'enzymes afin de former un produit réagissant avec une sonde pour générer un composé coloré. La densité optique (DO) a ensuite été lue simultanément à 570 nm sur toute la plaque grâce à un lecteur de plaque.

2.2.5 Immunomarquage de l'apoB48 et couplage par bille d'or pour la microscopie électronique en transmission.

Des grilles de Nickel (200 mesh) recouvertes de formvar-carbone ont été déposées sur une goutte (100µL) de milieu basal durant 2 minutes. Les sites non spécifiques ont été saturés avec de la BSA à 1% dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 pendant 10 minutes à température ambiante (T_{Amb}). Les grilles ont été ensuite incubées pendant 2 heures à T_{Amb} dans une chambre humide avec une

solution d'anticorps polyclonal anti-ApoB48 Homme (anti-lapin, dilution 1/1000, Abcam) réalisée dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Elles ont ensuite été rincées successivement dans un tampon Tris-HCl 50 mM, à pH 7,4 puis à pH 8,2 à T_{Amb}. Elles ont ensuite été incubées pendant 45 min à T_{Amb} dans une chambre humide avec de la BSA à 1% dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 puis pendant 45 min à T_{Amb} dans une solution d'anticorps secondaire anti-IgG lapin (anti-chèvre, dilution 1/80, Tebu bio) couplés à des billes d'or (10 nm, Tebu bio) réalisée dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 avec 1 % de BSA. Les grilles ont été rincées successivement dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 et pH 7,4 puis dans de l'eau distillée filtrée à T_{Amb}. Enfin, les immunocomplexes ont été fixés dans du glutaraldéhyde 4% (v/v) pendant 2 minutes et colorés négativement avec de l'acide phosphotungstique 2% (v/v) pendant 2 minutes puis observées au microscope électronique en transmission (Jeol 1400 JEM, Tokyo, Japon) équipé d'une caméra Orius 600 et du logiciel Digital Micrograph. Ces manipulations ont été réalisées en collaboration avec Elisabeth Errazuriz-Cerda au Centre d'Imagerie Quantitative de la Faculté de médecine Lyon Est (CIQLE).

2.2.6 Mesure du diamètre hydrodynamique des micelles mixtes et des chylomicrons par granulométrie laser.

Le diamètre hydrodynamique des micelles mixtes incubées sur les cellules et des chylomicrons sécrétés par les Caco-2 a été mesuré par granulométrie laser à diffusion dynamique de la lumière sur un appareil Zetasizer NanoS (Malvern, Grande-Bretagne). Il s'agit de granulométrie par diffusion de lumière (Dynamic Light Scattering) aussi appelée spectroscopie de corrélation de photons (Photon Correlation Spectroscopy). Cette technique permet de mesurer le diamètre hydrodynamique de particules submicroniques. Le diamètre hydrodynamique correspond au diamètre des particules incluant l'épaisseur de la couche de solvatation. Ce type de mesure granulométrique repose sur le principe que toute particule illuminée par une source de lumière, telle qu'un laser, diffuse cette lumière. De plus une particule submicronique en solution n'est pas stationnaire ; elle est mobile du fait du mouvement brownien ; la particule entre en collision de manière aléatoire avec les molécules du liquide qui l'entourent. La vitesse des mouvements browniens est d'ailleurs liée à la taille de la particule. Comme l'intensité de la lumière diffusée par la particule fluctue dans le temps en fonction de son mouvement brownien et donc de son diamètre, le système utilise la mesure de cette fluctuation de l'intensité de lumière laser diffusée au cours du temps pour calculer le diamètre hydrodynamique des particules.

Lors de manipulations préparatoires, des résultats de granulométrie similaires ont été obtenus avec ou sans centrifugation des milieux (4 h, 12°C, 13000 rpm) et récupération des chylomicrons en surface. Il a donc été décidé ici d'utiliser directement les milieux pour effectuer cette mesure.

L'analyse a été effectuée à 37°C en tenant compte des propriétés du milieu dispersant DMEM : viscosité (0,84 mPa.s) et indice de réfraction (1,33).

2.2.7 Composition en espèces de sphingomyéline et céramide des micelles et du milieu basal

L'analyse des SM contenues dans le milieu basal a été réalisée par ESI-MS/MS. Brièvement, Les sphingolipides ont été extraits selon la méthode de Kirklund (Kyrklund, 1987), purifiés par saponification puis fractionnés sur colonne SPE C18:0 (Bond Elut, Agilent) en présence de standard interne (C16:0D31 sphingomyéline, Avanti Polar Lipids). A partir de l'extrait sec obtenu, les différentes espèces de SM ont été analysées par ESI-MS/MS (API4500QTRap; Sciex Applied Biosystems) en mode ion positif en utilisant la méthode de MRM (*Multi Reaction Monitoring*). La concentration de chaque espèce moléculaire a été calculée à partir du ratio de son signal sur celui du standard interne. La concentration totale en SM est la somme des concentrations de chaque espèce. Les concentrations ont été normalisées en rapportant sur la concentration en TG du milieu. Ces analyses ont été réalisées par David Cheillan au Centre de Biologie et de Pathologie Est (HCL).

2.2.8 Mesure de l'expression génique par RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits avec une solution de TRI Reagent, quantifiés par lecture de la DO à 260 nm au spectrophotomètre (Nanodrop) puis stockés au congélateur à -80°C. Le ratio A260/A280 a permis d'évaluer les éventuelles contaminations par les solvants d'extraction et les protéines ; un ratio entre 1,7 et 2,1 a été considéré comme correct. La rétro-transcription (RT) des ARN totaux en ADN complémentaires (ADNc) a ensuite été réalisée à partir d'1 µg d'ARN en présence d'un mélange réactionnel contenant 4µL de tampon (First Strand Buffer, 5X, Invitrogen) ; 2µL de DTT (0,1 M) ; 1µL de dNTP (10 mM, Invitrogen) ; 0,5µL d'oligo dT (0,5µg/µL, Promega) et 0,5µL de random hexamers (0,5µg/µL, Promega). Les ADNc des différents gènes à analyser ont ensuite été quantifiés par PCR quantitative en temps réel (qPCR) en utilisant un rotorgene 6000 (Corbett Research). L'expression des gènes a ensuite été normalisée par rapport à l'expression d'un gène ménage, la TATAbox binding protein (TBP). Ces analyses ont été réalisées par la plateforme de génomique du laboratoire.

La liste complète des gènes dosés sur les cellules Caco-2/TC7 (ainsi que dans les différents tissus des souris des études de digestion et de régime) est disponible en Annexe 1.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Effets de l'ajout de sphingomyéline sur la sécrétion des triglycérides par les cellules Caco-2/TC7.

Les traitements n'ont pas eu d'impact sur la TEER. En effet, pour les deux conditions, avec et sans SM, la variation de TEER n'était pas supérieure à plus de 20 % de la valeur initiale indiquant donc que la perméabilité de la monocouche cellulaire est restée intacte (données non montrées).

L'ajout de 0,4 mM de SM n'a pas d'effet sur la taille des micelles mixtes formées (Figure 24A). En revanche, après 24 h d'incubation, les micelles contenant la SM tendent à induire une augmentation de la sécrétion des TG dans le milieu basal ($P = 0.06$) (Figure 24B). L'ordre de grandeur des concentrations en TG obtenu est similaire à celui trouvé dans la littérature dans des conditions proches (Nauli et al., 2014). Enfin, l'ajout de SM induit une diminution du diamètre hydrodynamique moyen des CM secrétés dans le milieu basal ($P = 0.03$) (Figure 24C).

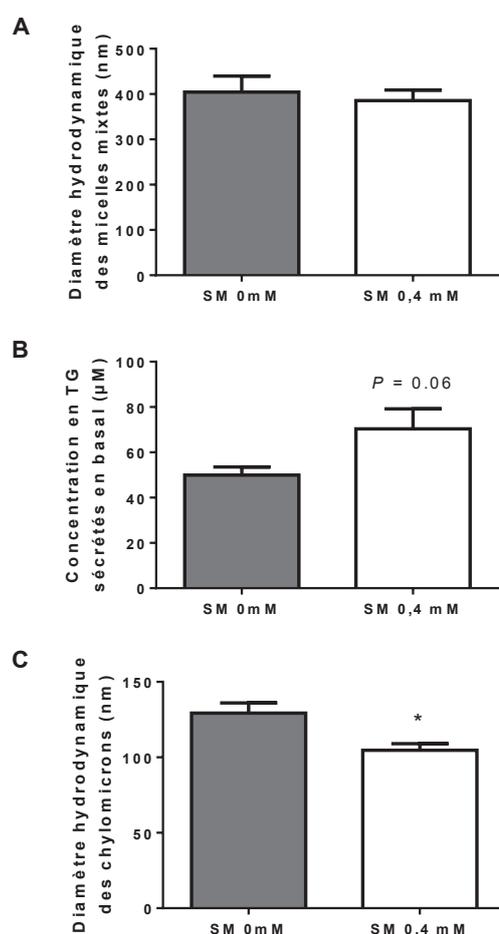


Figure 24 : Effets de l'ajout de 0,4 mM de sphingomyéline dans des micelles mixtes lipidique sur le diamètre des micelles (A), la sécrétion de TG (B) et le diamètre des chylomicrons sécrétés (C) par les cellules Caco-2/TC7 dans le milieu basal 24 heures après l'incubation. $n = 3$ (A, C) et $n = 5$ (B). Test de Student, * $P < 0.05$.

Par ailleurs, en présence de SM, la sécrétion d'une quantité plus importante de TG et de CM plus petits implique qu'un plus grand nombre de CM auraient été sécrétés. Nous n'avons malheureusement pas pu confirmer cette hypothèse. En effet, nous n'avons pas trouvé de dosage ELISA de l'apoB48 fonctionnant correctement sur nos milieux de culture (Uscn Life Science Inc. ; E91883Hu) et les Western blots effectués avec un anticorps anti-ApoB48 (Abcam) sur les protéines extraites des tapis cellulaires n'étaient pas de qualité satisfaisante. Nous avons donc eu recours à une autre méthode pour nous assurer de cet effet sur la sécrétion des CM : l'immunomarquage par bille d'or pour la microscopie électronique en transmission (MET). Notre objectif était de marquer les molécules d'apoB48 dans les milieux basolatéraux puis d'observer en MET la présence des billes indiquant une molécule d'apoB48. La technique n'a pas permis un comptage fiable des particules du fait de phénomènes trop importants de non-spécificité. En revanche, les images obtenues nous ont permis de confirmer les différences de taille des chylomicrons préalablement observées par granulométrie laser (Figure 25). En effet les images obtenues suite à l'incubation avec les micelles contenant de la SM montrent des tailles de particules sécrétées plus petites que celles observées sans SM.

L'observation occasionnelle de plusieurs billes par particule peut être expliquée par le fait qu'il s'agit d'une réaction indirecte, avec phénomène d'amplification possible. Plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur le même anticorps primaire. L'accessibilité des sites est conditionnée par la taille de la bille d'or. D'autre part, la protéine est composée de plusieurs épitopes qui peuvent être reconnus par plusieurs anticorps secondaires.

En résumé, sur des cellules Caco-2/TC7, l'ajout de SM dans les micelles mixtes lipidiques tend à induire la sécrétion d'une quantité plus importante de TG sous la forme de CM plus petits. Il est donc possible de mettre en parallèle ces résultats et ceux précédemment décrits (article J Nutr) chez la souris après un gavage avec l'émulsion MPL (stabilisée avec des LP laitiers) ou l'émulsion SPL (stabilisée avec des LP de soja). En effet les souris gavées avec l'émulsion MPL présentaient au bout d'1 h une tendance à une concentration plus élevée en TG plasmatiques ($P = 0,07$) sous la forme de plus petits CM ($P = 0,05$). L'obtention de résultats similaire sur les cellules avec l'ajout uniquement de SM suggère que l'effet observé chez les souris avec les LP laitiers serait dû, au moins en partie, à leur forte teneur en SM.

La similarités des résultats obtenus après 24 h d'incubation sur les cellules d'une part, et seulement 1 h après gavage chez la souris d'autre part, pourraient s'expliquer en partie : par le fait que (i) dans le milieu basal il n'y a pas d'élimination des CM produits mais une accumulation pendant toute la durée de l'incubation ce qui n'est pas le cas chez la souris, et (ii) les cellules Caco-2/TC7 sont un modèle d'étude et n'ont pas la même capacité sécrétrice que l'épithélium intestinal des souris. En effet, il est

décrit que les cellules Caco-2 auraient des capacités sécrétrices limitées en comparaison avec les entérocytes, notamment dû à une faible activité de la MGAT (voie du 2-monoglycéride) représentant 7 % de l'activité rapportée pour cette enzyme chez le rat dans le jéjunum (Mehran et al., 1997).

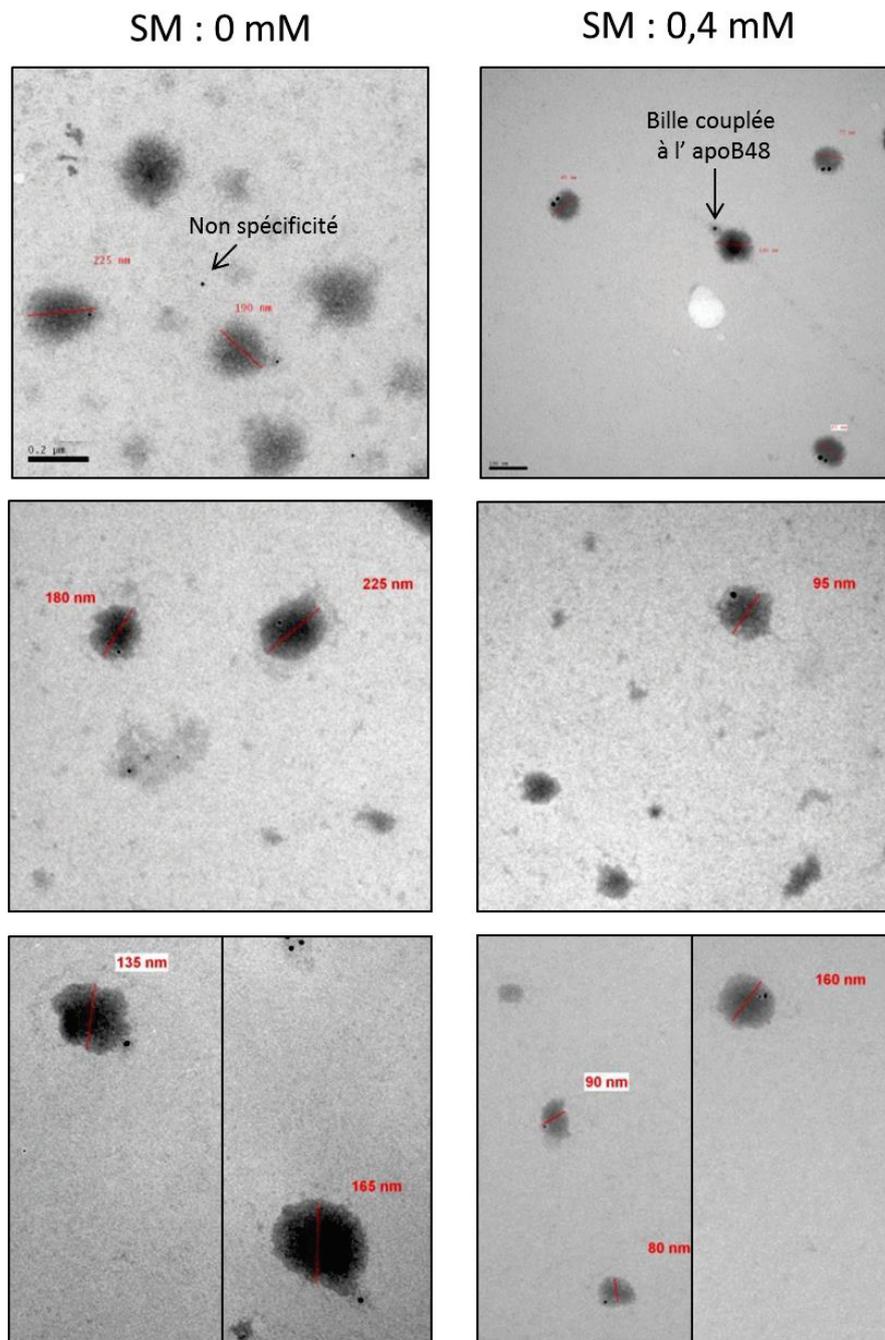


Figure 25 : Immunomarkage de l'apoB48 couplé à des billes d'or et observation au MET des milieux basolatéraux. Les images présentées ici sont représentatives des différentes coupes obtenues, n = 3.

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels la SM influence la sécrétion des CM par les entérocytes, l'expression des protéines impliquées dans l'absorption des lipides et la synthèse des CM a été analysée. De plus, afin de suivre le devenir de la SM dans la cellule, l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme de la SM a également été dosée ainsi que la sécrétion de SM dans le milieu basal. Ces manipulations ont été réalisées par Marine Milard au cours de son stage de Master 2 recherche en complément de mes travaux de thèse. Nous devons souligner que ces derniers résultats *in vitro* ont été obtenus uniquement sur 3 puits de Transwell par traitement au cours de la même manipulation ; il n'est donc pas possible à ce jour de conclure fermement à un effet de la SM sur l'expression de ces protéines. Les expériences ci-dessous devront donc impérativement être réalisées à nouveau afin de s'assurer des effets de la SM sur le métabolisme lipidique *in vitro*.

2.3.2 Effet de l'ajout de sphingomyéline sur l'expression génique des protéines impliquées dans l'absorption lipidique et la formation des chylomicrons.

Dans cette expérience, la Figure 26 montre un effet de la présence de SM dans les micelles sur l'expression génique de certaines protéines du métabolisme lipidique intestinal. En effet une diminution de l'expression du transporteur membranaire FATP4 ($P < 0.05$) et une augmentation de l'expression de Sar1b ($P < 0.01$), impliqué dans le transfert des pré-CM vers le Golgi, est observée en présence de SM dans les micelles. De plus une tendance à la diminution de l'expression de SR-B1 ($P = 0.08$), impliqué dans le captage du cholestérol et dans la détection des micelles par l'entérocyte, et de MTTP ($P = 0.07$), impliqué dans le transfert des TG sur les pré-CM, est également observée.

La présence de SM pourrait avoir entraîné le captage de suffisamment de lipides par la cellule et donc un rétrocontrôle de l'expression des transporteurs FATP4 et SR-BI. Par ailleurs la présence de SM à l'interface des micelles pourrait avoir diminué la capacité de reconnaissance des micelles par le récepteur SR-BI et donc son expression génique. L'ensemble des gènes dosés semblent tendre vers une moindre expression en présence de SM dans les micelles à l'exception de Sar1b qui est plus fortement exprimé. L'augmentation de l'expression de Sar1b peut être mise en lien avec un transfert plus important de CM au Golgi. Avec la tendance à la diminution de l'expression de MTTP, moins de TG transférés sur les CM pourraient ainsi avoir entraîné la production de chylomicrons plus petits. Enfin, très récemment, MTTP a été montré comme jouant un rôle dans la sécrétion des sphingolipides par les entérocytes. Ainsi, comme pour les TG, la MTTP permettrait le transfert de SM et de céramide sur les CM lors de leur production (Iqbal et al., 2015). Dans notre étude *in vitro*, l'ajout de SM entraîne une tendance à la diminution de l'expression génique de MTTP. En revanche chez la souris, 1 h après gavage avec l'émulsion MPL, une augmentation de l'expression de MTTP ($P < 0.01$) dans le jéjunum avait été observée par rapport l'émulsion SPL.

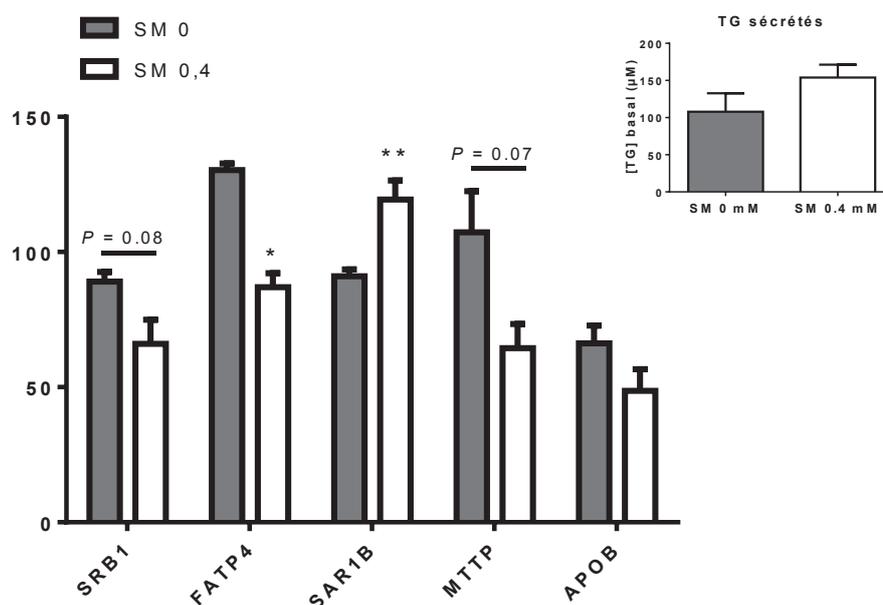


Figure 26 : Expression génique des protéines du métabolisme lipidique après incubation de micelles mixtes lipidiques avec ou sans 0,4 mM de sphingomyéline. (A) Expression génique, niveau d'ARNm du gène ciblé sur celui du gène de référence, TBP, n = 3 puits. (B) Concentration de TG sécrétés dans le milieu basal, n = 3 puits. Test de Student, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Avant d'exercer d'éventuels effets à l'intérieur de l'entérocyte, la SM présente dans les micelles doit être métabolisée en céramide puis en sphingosine qui, une fois dans la cellule, peuvent permettre la re-synthèse de SM. L'ensemble de ces phénomènes a donc été étudié au sein des cellules Caco-2/TC7.

2.3.3 Effet de l'ajout de sphingomyéline sur la sécrétion de sphingomyéline et son métabolisme.

L'incubation de micelles ne contenant pas de SM conduit à une faible sécrétion de SM dans le milieu basal (4,2 nmol/mg de TG). En revanche, l'incubation de micelles contenant 0,4 mM de SM, induit une sécrétion plus de 10 fois plus importante de SM (59,4 nmol/mg de TG). Les valeurs ont été normalisées par les concentrations de TG dans le milieu basal. Ainsi, nous pouvons conclure que l'augmentation de sécrétion de SM n'est pas due à une augmentation globale de la sécrétion des lipides (Figure 27).

Afin de caractériser la capacité des cellules Caco-2 à métaboliser la SM incubée, nous avons analysé l'expression génique des enzymes responsables de sa digestion dans le tractus, la sphingomyélinase alcaline (ENPP7), et de sa re-synthèse dans la cellule, les sphingomyéline synthases 1 et 2 (SGMS1 et SGMS2) (Figure 27). L'expression génique d'ENPP7 est diminuée suite à l'ajout de SM ($P < 0.05$).

L'expression génique de SGMS1, localisée principalement dans le Golgi, ne varie pas tandis que celle de SGMS2, localisée principalement dans la membrane plasmique, augmente ($P < 0.01$). Ces résultats montrent que la SM présente dans les micelles peut induire les voies du métabolisme des sphingolipides dans les cellules Caco-2/TC7, conduisant à la sécrétion par celles-ci de SM dans le milieu basolatéral.

Ce résultat est en accord avec la plus forte concentration en SM retrouvée dans les CM des souris gavées avec l'émulsion MPL (riche en SM) en comparaison avec l'émulsion SPL (dépourvue de SM).

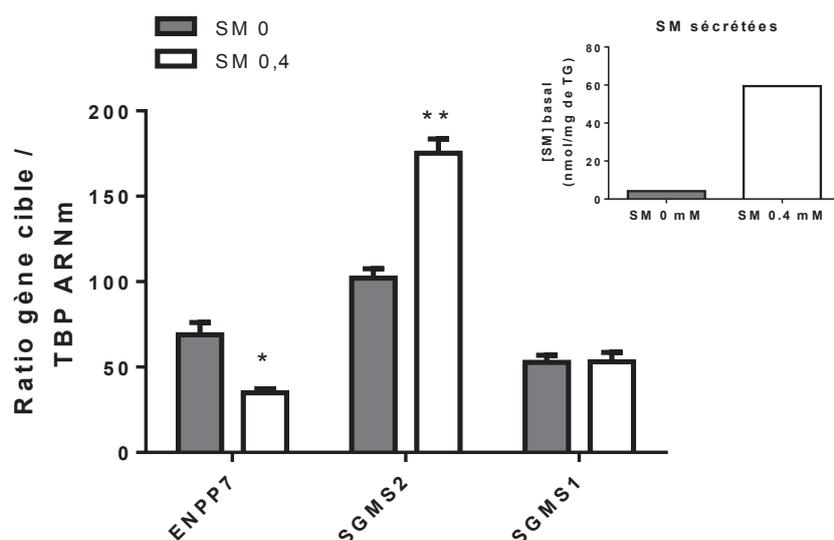


Figure 27 : Expression génique des protéines impliquées dans le métabolisme de la sphingomyéline. $n = 3$ puits, Test de Student, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **Insert : sécrétion de sphingomyéline dans le milieu basolatéral, $n=1$ puit.**

La Figure 28 montre le profil en espèces de SM présentes dans les micelles incubées contenant 0,4 mM de SM et dans le milieu basolatéral après 24 h d'incubation avec ces micelles. Les micelles contiennent en majorité des espèces moléculaires SM-22:0 (32,7 %), SM-16:0 (24,6%), SM-24 :0 (17,3 %) et SM-20:0 (11,5%). La SM issue du lait est connue pour sa richesse en AGS à longues chaînes (22:0, 23:0, 24:0) (Byrdwell et al., 2007; Karlsson et al., 1998). Ce profil correspond donc bien à celui de la SM laitière utilisée pour préparer les micelles (Avanti Polar Lipids). En revanche après 24 h d'incubation, le profil en espèces de SM sécrétées dosé dans le milieu basal est très différent. En effet, une proportion plus importante de SM-16:0 (42,1%) et beaucoup moins d'importante de SM-22:0 (9,6%), SM-24 :0 (4,14 %) et SM-20:0 (15,3%) est retrouvée dans le milieu basal en comparaison avec le profil initial des micelles incubées.

Pour mettre en perspective ces résultats avec certains autres décrits *in vivo*, nous devons souligner que l'espèce SM-16:0 est aussi celle retrouvée principalement dans les CM d'hommes sains 8 h après

avoir consommé 20 g de beurre (Wood et al., 1964). Dans nos travaux chez la souris 1 h après le gavage c'est l'espèce SM-24:1 qui majoritaire, suivi par la SM-16:0 quel que soit le type d'émulsion (MPL ou SPL) (données non montrées).

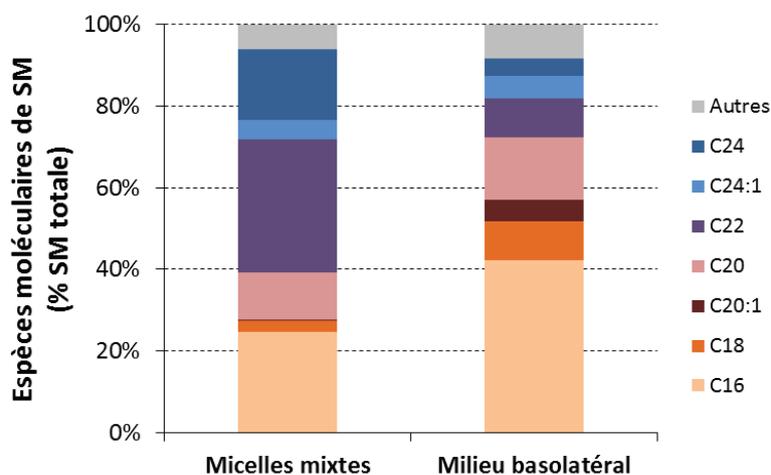


Figure 28 : Profil en principales espèces moléculaires de sphingomyéline dans les micelles mixtes incubées contenant 0,4mM de sphingomyéline et dans le milieu basolatéral après 24 heures d'incubation avec ces micelles. % de la concentration totale en SM, n = 1.

L'étude du métabolisme de la SM nous a permis de confirmer la capacité des cellules Caco-2/TC-7 à métaboliser la SM laitière qui n'est pas absorbée intacte par la cellule. La stimulation avec 0,4 mM de SM induit une augmentation de la quantité totale de SM sécrétée par les cellules. De plus, le profil en espèces moléculaires de SM retrouvées dans le milieu basolatéral est différent de celui mesuré dans les micelles déposées en apical, suggérant la contribution importante d'une synthèse et une sécrétion endogène de SM par la cellule. Ainsi l'expression de la SGMS2, qui permet la synthèse *de novo* de SM, est augmentée parallèlement à une augmentation de la proportion de SM-16:0 dans le milieu basal en comparaison avec les micelles incubées initialement. L'ensemble de ces résultats révèle une synthèse endogène de SM lors de l'incubation de micelles mixtes lipidiques contenant 0,4 mM de SM qui s'expliquerait par une augmentation de l'expression de SGMS2. De plus l'incubation avec 0,4 mM de SM induit un rétrocontrôle négatif sur l'expression de l'Alk-SMase (ENPP7), potentiellement dû à la production d'une quantité suffisante de métabolites actifs pour les cellules. Il semble donc possible que l'accumulation de produits du métabolisme de la SM après 24 h d'incubation induise une synthèse *de novo* de SM par la cellule permettant de faire face à l'excès de métabolites et ainsi de prévenir une éventuelle toxicité. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents du métabolisme intracellulaire des sphingolipides est aujourd'hui nécessaire afin de comprendre l'importance métabolique de la sécrétion endogène de SM au niveau intestinal en réponse à l'apport de SM alimentaire, de même que l'impact de l'augmentation de la concentration de SM observée *in vitro* et *in vivo*.

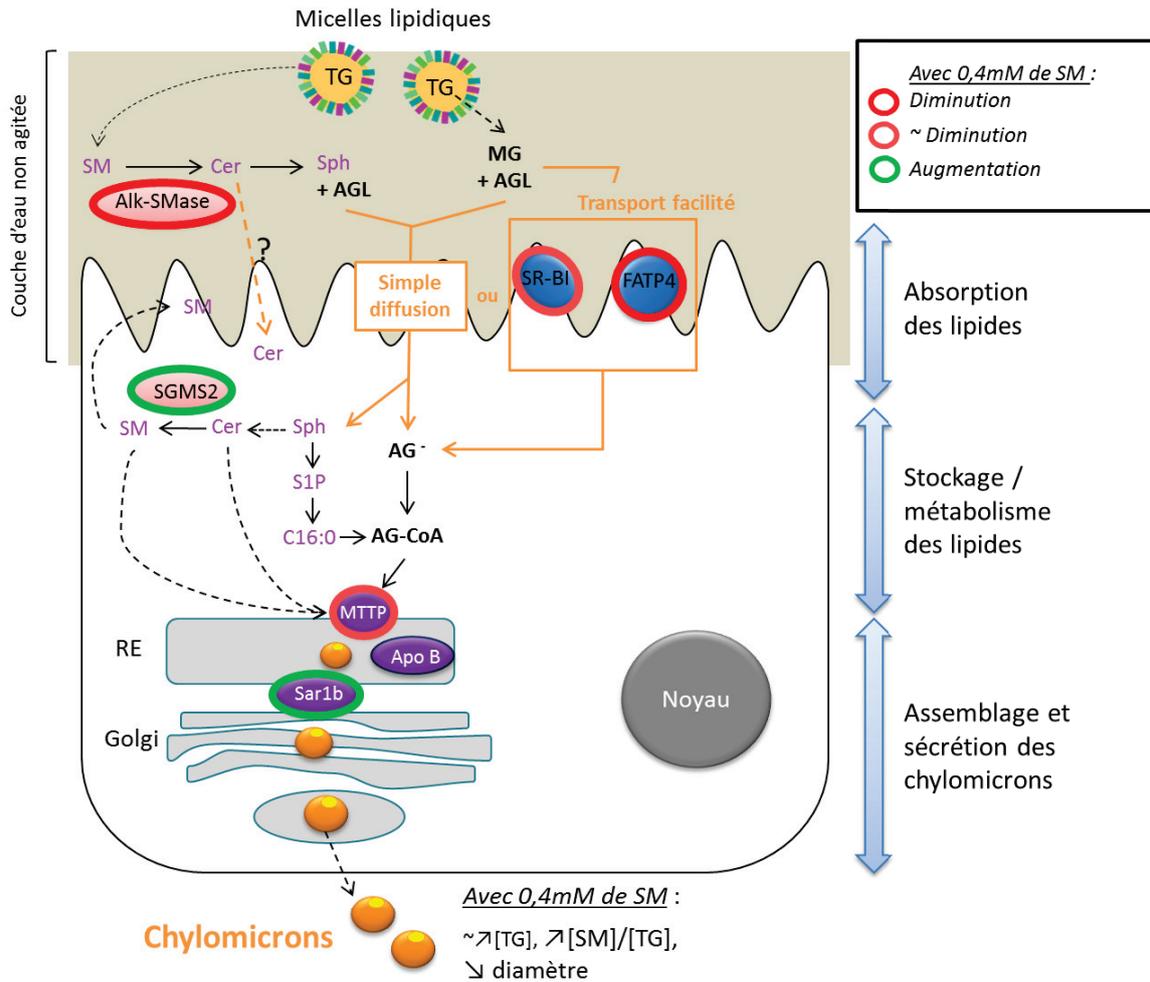


Figure 29 : Schéma bilan des effets de l'incubation de micelles mixtes enrichies ou non en sphingomyéline sur l'absorption lipidique et la synthèse de chylomicrons par les cellules Caco-2/TC7. Source : librement inspiré de (Seyer et al., 2013) et complété par nos résultats. « ~ » signifie qu'il s'agit d'une tendance.

3 Etude clinique VALOBAB Digestion

3.1 Objectifs

Les résultats obtenus chez la souris démontrent un impact de l'utilisation de LP laitiers pour émulsionner la matière grasse, en comparaison avec des LP de soja, sur la digestion des lipides et la lipémie postprandiale. Cependant ces résultats ne peuvent pas être directement transposés à l'Homme dont le métabolisme lipidique hépatique et plasmatique est différent de celui des rongeurs. C'est pourquoi des études chez l'Homme sont nécessaires pour déterminer les mécanismes qui relient les spécificités structurales des LP laitiers à leur digestion et à leurs effets sur la santé.

Notamment, il est important d'élucider les voies par lesquelles les LP laitiers sont métabolisés dans l'intestin humain. En effet, certains des mécanismes par lesquels les micro-composés alimentaires exercent leurs effets dépendent de leur devenir dans le tractus digestif. Il s'agit notamment de leur hydrolyse enzymatique, de leur interaction avec les sels biliaires, de leur absorption intestinale mais aussi du passage des métabolites résiduels non absorbés vers le côlon. Ohlsson et al. ont montré récemment que (i) l'iléon et le côlon humains sont exposés à de la SM endogène et exogène et à leurs métabolites et que (ii) des doses modérées de SM alimentaire pourraient accroître cette exposition (Ohlsson, Hertervig, et al., 2010). Toutefois, cette étude a été réalisée avec de la SM purifiée, administrée de façon modérée dans une boisson. Il nous est donc apparu nécessaire d'identifier chez l'Homme la quantité de SM et de ses métabolites, ainsi que les produits de lipolyse, se trouvant dans le tractus digestif après l'ingestion de produits alimentaires réalistes riches en LP laitiers administrés dans un vrai repas. De plus, les résultats obtenus chez l'animal suggèrent que ces produits de lipolyse et ces différents sphingolipides sont à même de moduler l'absorption des TG et par conséquent le métabolisme lipidique postprandial ; ceci reste à démontrer chez l'Homme.

Nous avons donc mis en place une étude clinique dont l'objectif est d'étudier l'impact de la teneur en LP laitiers d'un produit fromager sur (i) l'afflux de SM et de produits de lipolyse des lipides dans l'iléon et (ii) l'absorption et le métabolisme postprandial des acides gras et du cholestérol. Pour cela l'étude est réalisée sur des personnes porteuses d'une iléostomie terminale (voir paragraphe 3.3.1). Cette étude est réalisée dans le cadre du projet ANR VALOBAB en étroite collaboration avec Corinne Malpuech-Brugère de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH) de Clermont-Ferrand pour la partie clinique et métabolique, avec Florent Joffre (ITERG) concernant certaines analyses lipidiques et avec l'ENILIA de Surgère (équipe Actalia) pour la préparation des produits tests ; ces équipes étant partenaires du projet ANR.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Plan d'étude

Il s'agit d'une recherche biomédicale expérimentale, bicentrique (Lyon et Clermont-Ferrand), contrôlée contre placebo, randomisée en double aveugle et en croisé (*cross-over* ; trois séquences), réalisée en aigu chez des volontaires iléostomisés. Les séquences correspondent à l'étude de digestion de trois repas tests séparés chacun par une période de « lavage » (*wash-out*) de quatre à six semaines entre chaque exploration. Le recrutement de six volontaires par centre était prévu. Compte tenu des nombreuses difficultés rencontrées en pratique au recrutement de ce type de patients, à Lyon quatre volontaires ont été recrutés.

Chaque sujet a réalisé quatre visites au Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), qui a reçu l'agrément pour la recherche sans bénéfice individuel direct : une visite d'inclusion (au minimum à J-8) et trois journées d'exploration métaboliques. Lors des journées d'exploration métaboliques, les sujets volontaires à jeun depuis la veille au soir ont consommé l'un des trois repas test (petit déjeuner). Les différents repas étaient composés soit d'un produit fromager contrôlé (« placebo » du protocole, pauvre en LP laitiers) ou enrichi avec 3 g de LP laitiers ou enrichi avec 5 g de LP laitiers. Chaque sujet a bénéficié de chacun de ces trois repas dans un ordre aléatoire (après tirage au sort) et a donc été son propre témoin. La durée totale de l'étude a été de 9 semaines minimum pour l'ensemble des sujets.

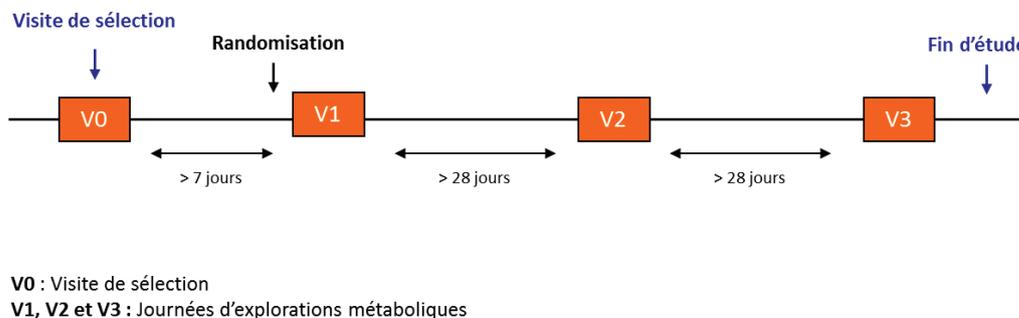


Figure 30 : Schéma du déroulement de l'ensemble de l'étude clinique pour un volontaire.

Afin de caractériser la cinétique d'absorption des AG et du cholestérol exogènes, chaque produit a été additionné d'un mélange de traceurs lipidiques. Les lipides tracés étaient un TG et du cholestérol libre. Le traceur TG utilisé était la [1,1,1]-¹³C-trioléine dont chaque AG contient un atome de l'isotope stable ¹³C qui peut être suivi jusque dans le CO₂ expiré ; le traceur cholestérol utilisé était le ²H₆-cholestérol afin de pouvoir assurer le suivi de la molécule avec un autre isotope que celui utilisé pour le TG traceur. Les traceurs lipidiques ont été ajoutés aux fromages au début de chaque journée d'exploration, dans la cuisine du CRNH. Ces traceurs sont des molécules naturelles, non radioactives ;

ils ont été préalablement contrôlés par un pharmacien praticien hospitalier (pharmacie du centre hospitalier Lyon-Sud) afin de délivrer leur certificat final d'aptitude à la consommation.

En dehors des journées d'exploration, les sujets devaient poursuivre leur alimentation et activité physique habituelles, hormis :

- la semaine précédant les journées d'exploration métabolique et le jour suivant, les sujets ont dû s'abstenir de consommer des aliments naturellement riches en ^{13}C (notamment riches en amidon de maïs),
- la veille au soir de chaque test, les sujets devaient manger un repas standardisé établi par la diététicienne du CRNH.

3.3 Sujets

3.3.1 Choix des personnes iléostomisées et recrutement

Une stomie est une déviation chirurgicale d'un conduit naturel. L'iléostomie consiste à suturer l'iléon à la peau de la paroi abdominale. Ainsi le transit intestinal est dérivé directement de l'iléon vers l'extérieur et les selles s'évacuent par l'orifice de l'iléostomie, ce qui nécessite le port d'une poche de recueil. L'iléostomie est nécessaire lors de maladies ou de blessure rendant le côlon incapable de remplir son rôle. Une iléostomie doit en général être pratiquée pour les raisons suivantes :

- Rectocolite hémorragique (ou colite ulcéreuse), maladie inflammatoire chronique de la muqueuse du gros intestin ;
- Maladie de Crohn, maladie inflammatoire chronique de l'ensemble des parois de l'intestin, le plus souvent retrouvée au niveau de l'iléon et du côlon ;
- Polypose adénomateuse familiale, développement de polypes-adénomes dans le côlon et le rectum évoluant en général vers une cancérisation ;
- Cancer colorectal ;
- Blessures ;
- Malformations chez les nouveaux-nés et les enfants.

L'iléostomie est en général pratiquée dans la partie droite du bas ventre. Elle peut-être temporaire (ou de décharge), lorsque les chirurgiens désirent conserver la continuité des deux segments sectionnés mais ne peuvent le faire dans l'immédiat, ou définitive en cas d'atteinte trop importante du côlon. Dans le cas d'une iléostomie définitive, la partie terminale de l'iléon est reliée à l'extérieur par un orifice pratiqué dans la paroi abdominale (Figure 31).

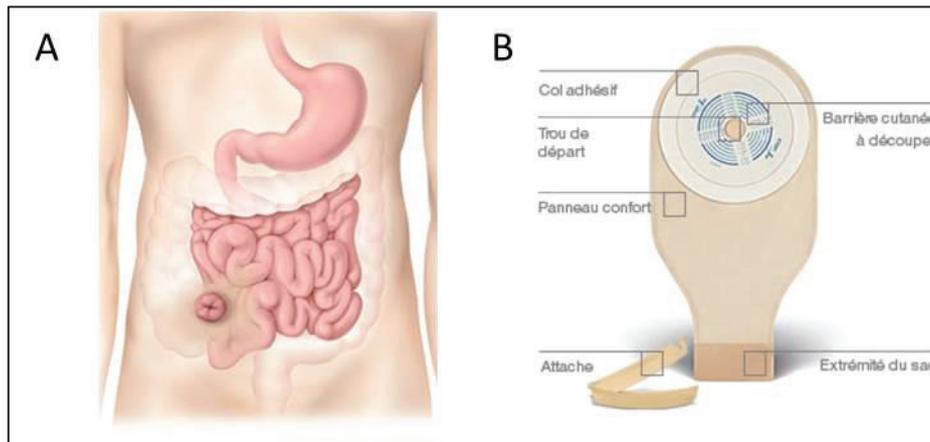


Figure 31 : Schéma d'une iléostomie (A) et poche de recueil (B). Source : Convatec®

Il a été décidé de réaliser cette étude sur des personnes porteuses d'une iléostomie terminale de manière à pouvoir étudier spécifiquement le devenir des lipides alimentaires en sortie d'iléon. Nous recherchions de telles personnes avec un intestin grêle sain afin d'avoir un métabolisme le plus proche possible de ceux d'individus sains. C'est pourquoi les personnes porteuses d'une iléostomie suite à une maladie de Crohn non localisée uniquement au niveau colique ou à un cancer colorectal non guéri n'ont pas été incluses dans le protocole (voir paragraphe 3.3.2). De plus, la résection terminale de l'intestin grêle effectuée lors de la chirurgie ne devait pas être de plus de 40 cm pour éviter des biais liés à une altération du cycle entéro-hépatique des sécrétions biliaires.

Les sujets ont été recrutés avec l'aide des médecins gastroentérologues ou chirurgiens digestifs collaborateurs des deux centres de recherche clinique qui suivent les patients. A Lyon, il s'agit du Dr Yves François et du Pr Eddy Cotte, chirurgiens au service de chirurgie digestive de l'hôpital Lyon Sud qui sur la base de nos critères de recherche nous ont fournis une liste de leurs patients pouvant correspondre. Un courrier d'information a alors été envoyé à ces personnes puis je les ai contactées individuellement par téléphone afin de leur expliquer plus en détails le protocole et de voir avec eux s'ils souhaitaient participer. Les personnes intéressées ont été convoquées pour une visite d'inclusion.

3.3.2 Critère d'inclusion/d'exclusion

Lors de la visite d'inclusion, le médecin du CRNH a contrôlé que le sujet répondait aux différents critères d'inclusion requis pour l'entrée dans le protocole.

Les critères d'inclusion principaux étaient les suivants :

- 18 ans ≤ âge < 75 ans
- Homme et femme
- Iléostomie temporaire ou définitive secondaire à :

- ✓ Rectocolite hémorragique
- ✓ Maladie de Crohn colique pure
- ✓ Lésion péri-anale
- ✓ Polypose adénomateuse familiale
- Iléostomie considérée comme fonctionnelle
- Iléostomie stable depuis plus de 2 mois et un débit de stomie inférieur à 1L/jour sans Imodium® (anti-diarrhéique).
- Absence d'intolérance aux produits laitiers
- Cholestérol total <7 mmol/l, triglycérides <3 mmol/l

En parallèle, le médecin a également vérifié que le sujet ne présentait aucun des critères d'exclusion pouvant compromettre sa participation à l'étude.

Les critères de non inclusion principaux étaient les suivants :

- Iléostomie secondaire à un cancer digestif non encore guéri
- Iléostomie secondaire à une maladie de Crohn autre que colique pure
- Allergie ou intolérance aux produits laitiers
- Sujets traités par un médicament pouvant interférer avec le métabolisme des lipides
- Aspartate Amino Transférase (ASAT), Alanine Amino Transférase (ALAT) > 2 fois les valeurs normales

La liste complète des critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude sont disponibles en annexe (Annexe 2).

3.4 Repas tests

Produit fromager enrichi en LP laitiers

Au sein de l'Ecole Nationale des Industries Laitières et Alimentaires (ENILIA) de Surgères, partenaire du projet ANR, l'équipe ACTALIA a produit dans sa plateforme alimentaire agréée un concentré de babeurre riche en LP laitiers pour être utilisé comme ingrédient dans les produits testés. L'équipe ACTALIA a produit ensuite les produits fromagers plus ou moins enrichis en LP (non enrichi ou enrichi à 3 g ou 5g de LP laitiers) qui ont été consommés par les volontaires après vérification de la qualité microbiologique et de la DLUO (5 mois) par ACTALIA. La teneur en lipides des produits a été vérifiée à l'ITERG et au laboratoire CarMeN.

L'étude étant réalisée en double aveugle, chacun des trois produits fromagers a reçu un code couleur particulier. L'attribution du code couleur par type de produit n'était connue que des producteurs des

produits fromagers ; les expérimentateurs du centre clinique et les volontaires ne savaient pas à quel produit correspondait chaque couleur. Le producteur des produits fromagers indiquera le code au moment de la levée d'aveugle après analyse statistique des données.

Les produits ont été étiquetés avec la première lettre du code couleur, une gommette de couleur correspondante, le nom de l'étude, le lieu et la date de production, les conditions de conservation et la date d'expiration du produit. Les produits fromagers ont été distribués dans des barquettes en plastique avec film thermoscellé surmonté d'un couvercle contenant 100 g de produit.

Petit déjeuner et collation

Les explorations métaboliques ont consisté en la prise d'un petit déjeuner contenant thé ou café, 50 g de pain, 10 g de beurre, 30 g de confiture et l'un des trois produits fromagers suivants : 100 g de produit contrôle (« placebo » du protocole, pauvre en LP laitiers) ou 100 g de produit à dose moyenne de 3 g de LP laitiers ou 100 g de produit à dose élevée de 5 g de LP laitiers. De plus, 300 mg de [1,1,1]-¹³C-trioléine et 45 mg de ²H₆-cholestérol ont été incorporé dans une partie du fromage (voir procédure ci-dessous). Au total, le petit déjeuner apportait 458,15 Kcal dont 14,9 % de protéines (soit 17,1 g), 43,5 % de lipides (soit 22,2 g) et 41,6 % de glucides (soit 47,6 g).

De plus au bout de 4 heures, une collation standardisée (la même pour les trois journées d'exploration) a été servie aux volontaires. Cette collation a été conçue avec la diététicienne du CRNH-RA pour être pauvre en lipides, afin de ne pas influencer la cinétique de lipémie du produit fromager testé, et riche en glucides, pour permettre au sujet d'avoir suffisamment d'énergie pour « tenir » les 4 h restantes de test. Elle était constituée de 50 g de pâtes nature sans œuf sans matière grasse et sans sel, 50 g de pain, 100 g de compote, 250 g de fromage blanc 0 % et 10 g de sucre. Au total la collation apportait 469,7 Kcal dont 15,3 % de protéines (soit 18 g), 3,3 % de lipides (soit 1,7 g) et 81,4 % de glucides (soit 95,6 g).

J'ai moi-même mis en place la procédure et réalisé le mélange des traceurs lipidiques dans les produits fromagers. La veille de chaque journée d'exploration métabolique, les traceurs lipidiques ont été pesés environ exactement dans un creuset en téflon et stockés à 4 °C pendant la nuit. Le matin du test, dans la cuisine du CRNH-RA :

- le creuset contenant les traceurs a été chauffé au bain marie à 70°C pendant 10 min afin d'obtenir un mélange homogène ;
- le creuset a ensuite été sorti du bain marie et une cuillère à café du produit fromager à tester a été ajoutée dans le creuset. Le fromage et les traceurs ont été bien mélangé avec la cuillère afin d'obtenir un mélange liquide et homogène ;

- avec la même cuillère le mélange fromage-traceurs a été étalé sur une tartine de pain puis le reste du fromage a été rajouté par-dessus.
- Le creuset et la cuillère ont été amenés au volontaire sur le plateau du petit déjeuner avec pour consigne de bien lécher la cuillère et de saucer le creuset avec le pain restant afin que l'intégralité des traceurs soit consommée.

3.5 Journée d'exploration métabolique

Les journées métaboliques se sont déroulées de 7h30 à 16h30, chaque sujet arrivant au CRNH Rhône-Alpes à jeun depuis la veille au soir (12 h de jeun).

A leur arrivée, les mesures anthropométriques et tensionnelles étaient réalisées ainsi que la mesure de la composition corporelle par bio-impédancemétrie.

Chaque journée se divisait en deux parties :

- une période basale (T-30 à T0) au cours de laquelle les conditions basales (à jeun) étaient mesurées,
- une période postprandiale de 8 h consécutive à la prise du petit déjeuner servi à T0 avec le produit fromager test (T15 à T480). Cette période est séparée par la prise de la collation au bout de 4 h après la prise du petit déjeuner.

Le petit déjeuner a été consommé en 15 minutes et la collation en 20 minutes.

Les volontaires sont restés en décubitus pendant les 8h30 de journée test et en évitant de dormir du fait des mesures par calorimétrie indirecte. Au cours de la journée d'exploration, les sujets ne pouvaient consommer que de l'eau en dehors des repas (maximum 500 mL).

Il a été demandé aux volontaires de ramener au centre, le matin du test, le contenu de leur poche d'iléostomie au réveil (basal). Les efflux iléaux ont ensuite été recueillis après la prise du petit-déjeuner toutes les deux heures jusqu'à 8 h afin d'évaluer la cinétique d'apparition des lipides, produits de lipolyse, traceurs lipidiques (D-cholestérol et ^{13}C -oléate) et les sels biliaires dans l'iléon. De même des prélèvements sanguins ont été réalisés (75 mL par journée test) à jeun et toutes les deux heures afin de suivre entre autres l'évolution des concentrations plasmatiques en TG, AGNE, traceurs lipidiques (D-cholestérol et ^{13}C -oléate), phospholipides et sphingolipides. En parallèle, des mesures de calorimétrie indirecte ont été effectuées en continu sur la journée afin de calculer l'oxydation totale des nutriments. La journée a aussi été ponctuée par des tests respiratoires (*breath tests*) toutes les heures, afin de déterminer l'enrichissement isotopique en carbone 13 du CO_2 expiré. Il a également été demandé au sujet de continuer la collecte de leurs efflux iléaux pendant 24 h post-test (dans des pots spécifiques fournis et avec pour consigne de les congeler) et d'effectuer un test

respiratoire le soir (20 h) et le lendemain (8 h). Les tubes de test respiratoire et les efflux iléaux congelés ont été ramenés au CRNH lors de la visite suivante.

La Figure 32 ci-après décrit le déroulement de la journée d'exploration.

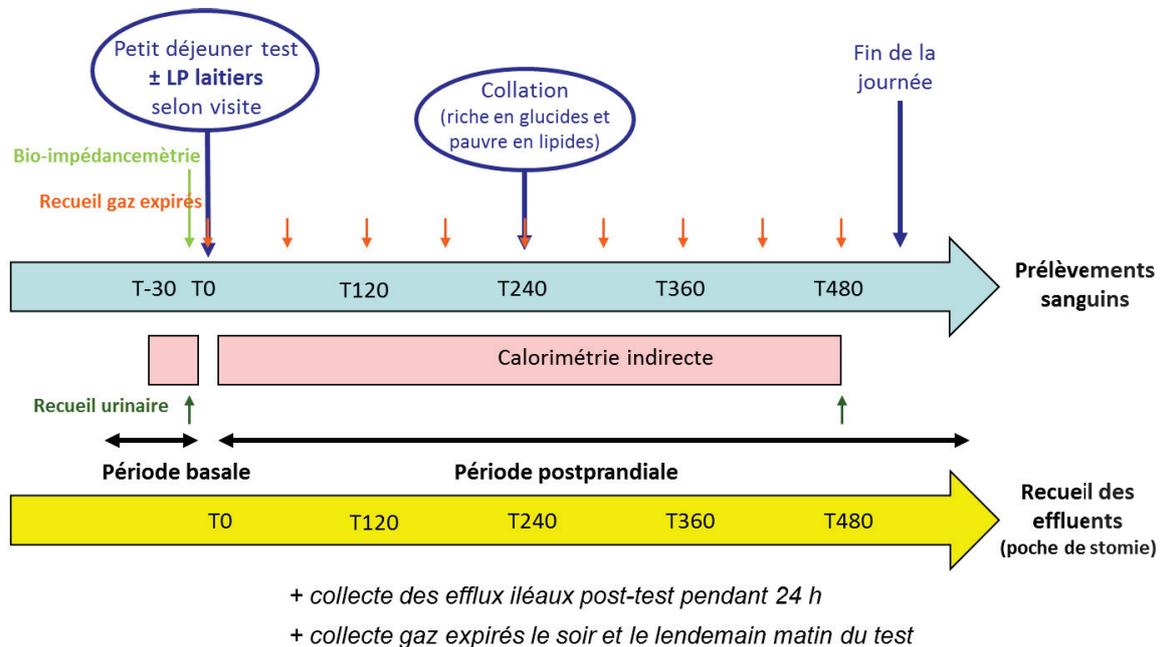


Figure 32 : Déroulement d'une journée d'exploration de l'étude VALOBAB Digestion

3.6 Analyses

3.6.1 Mesures anthropométriques

Les sujets ont été pesés grâce à une balance numérique calibrée (SECA®). Leur taille a été mesurée à l'aide d'une toise, leurs tours de taille et de hanche avec un ruban à mesure.

3.6.2 Séparation des lipoprotéines

Après avoir prélevé les échantillons sanguins à l'aide d'un cathéter brachial dans les tubes appropriés (avec ou sans EDTA), le plasma a été séparé par centrifugation (1500 g, 4°C, 10 min), puis aliquoté et placé à -20°C ou -80°C selon le type de dosage ultérieur.

La séparation de la fraction dite riche en chylomicrons (FRCM) a été réalisée sur plasma frais, conservé à 4°C une nuit afin d'éviter toute altération des CM par la technique courante d'ultracentrifugation qui repose sur la flottaison des lipoprotéines en fonction de leur densité. Pour chacun des prélèvements, 1 mL de plasma a été réparti dans quatre tubes (4x250 µL) contenant chacun 850 µL d'eau ultra pure apyrogène. Les échantillons ont été centrifugés à 12°C pendant 30 minutes à 80 000 rpm (soit 600 000 g) à l'aide d'une ultracentrifugeuse Kendro (Asheville, Caroline

du Nord, Etats-Unis). Les surnageants ont ensuite été délicatement récupérés et rassemblés dans un même tube afin de mesurer le volume de fraction récupéré (nécessaire au calcul de concentration des TG). Différents aliquots ont ensuite été réalisés pour les diverses analyses.

3.6.3 Dosage des triglycérides et du cholestérol et analyse granulométrique dans les fractions riches en chylomicrons

Les concentrations de TG et cholestérols de la FRCM ont été déterminées par méthode enzymatique colorimétrique sur un appareil AU 2700 Beckman Coulter® (O' Cllagan's mils, Irlande). Ces dosages ont été effectués au centre de Biochimie Lyon Sud (services des docteurs J. Draï et A. Charrié).

Le diamètre hydrodynamique moyen des particules se trouvant dans la FRCM a été déterminé par granulométrie laser. Pour le détail du fonctionnement de cette technique se référer au paragraphe 2.2.6. Ici l'analyse a été effectuée à 25°C en tenant compte des propriétés du milieu dispersant, le plasma : viscosité (1,0658 cP) et indice de réfraction du milieu (eau+plasma : 1,33) et des particules (1,45).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé immédiatement après le recueil.

3.7 Résultats préliminaires : concentration en triglycérides et cholestérol et diamètre de la fraction riche en chylomicrons.

Les sujets avaient un âge moyen de 43 ± 8 ans et un IMC de $25,8 \pm 2$ Kg/ m². La Figure 33A montre que le Produit 1 induit une concentration en TG de la FRCM plus faible en comparaison avec le Produit 2 à t = 240 min. A t = 360 min, le Produit 1 induit une concentration en TG et en cholestérol de la FRCM plus faible en comparaison avec le Produit 3 (Figure 33A et B). L'ANOVA à 2 facteurs met en évidence un effet global du temps sur les concentrations en TG et en cholestérol de la FRCM mais aucun effet global de la teneur en LP laitiers du produit fromager consommé (Figure 33A et B).

Concernant le diamètre des CM, un effet de la teneur en LP du fromage est observé à t = 120 min avec un diamètre plus petit avec le Produit 1 en comparaison avec le Produit 2 et 3 (Figure 33C). L'ANOVA à 2 facteurs met en évidence un effet global du temps et une tendance pour la teneur en LP laitiers du produit fromager consommé ($P = 0.11$).

Le Produit 1 induirait donc la sécrétion (i) à t = 120 min d'un plus grand nombre de plus petits CM en comparaison avec les Produits 2 et 3, (ii) à t = 240 min d'un plus petit nombre de CM de même diamètre en comparaison avec le Produit 2 et (iii) avec le Produit 3 à t = 360 min.

L'ensemble des résultats semble donc indiquer un effet de la teneur en LP laitiers du produit fromager consommé sur le diamètre à t = 120 min et sur la concentration en TG et en cholestérol de la FRCM à partir de t = 240 min.

Il est intéressant de remarquer que pour les trois groupes, le pic de concentrations en TG et en cholestérol de la FRCM est obtenu à $t = 240$ min ce qui ne correspond pas au pic d'augmentation du diamètre des CM qui a lieu à $t = 120$ min. Une interprétation possible serait que chez ces sujets, lors d'un afflux important d'AG alimentaires, les entérocytes privilégieraient d'abord une augmentation de la taille des CM avant d'en augmenter le nombre.

3.8 Autres analyses prévues.

Le critère de jugement principal de l'étude est la variation de la teneur en SM dans l'efflux iléal sur 8 heures selon le degré d'enrichissement en LP laitiers du produit fromager consommé dans un petit déjeuner. Le profil en différentes espèces moléculaires de SM permettra de déterminer si la consommation de LP laitiers au cours d'un petit-déjeuner entraîne un efflux plus important de SM laitière en sortie d'iléon. Par ailleurs, le contenu de l'efflux iléal en lipides totaux et en produits de lipolyse ainsi que l'enrichissement en carbone 13 des AG et en deutérium du cholestérol seront analysés afin d'évaluer d'éventuelles différences de digestion et d'absorption des lipides alimentaires en fonction de la teneur en LP laitiers du produit fromager consommé.

Au niveau plasmatique et dans la FRCM, les cinétiques d'apparition en phase postprandiale des TG, des LP et du cholestérol total ainsi que celles des traceurs lipidiques seront réalisées. Ces analyses permettront d'évaluer l'impact de la dose de LP laitiers sur la cinétique de lipémie postprandiale ainsi que sur la composition lipidique des lipoprotéines sécrétées. Le glucose et l'insuline, seront également dosés pour suivre le métabolisme glucidique selon la consommation d'un produit fromager enrichi ou non en LP laitiers.

Par ailleurs les mesures de calorimétrie indirecte et de gaz expirés ($^{13}\text{CO}_2$) permettront d'étudier l'impact des LP laitiers sur l'oxydation *in vivo* des substrats et des acides gras exogènes pendant 8 heures.

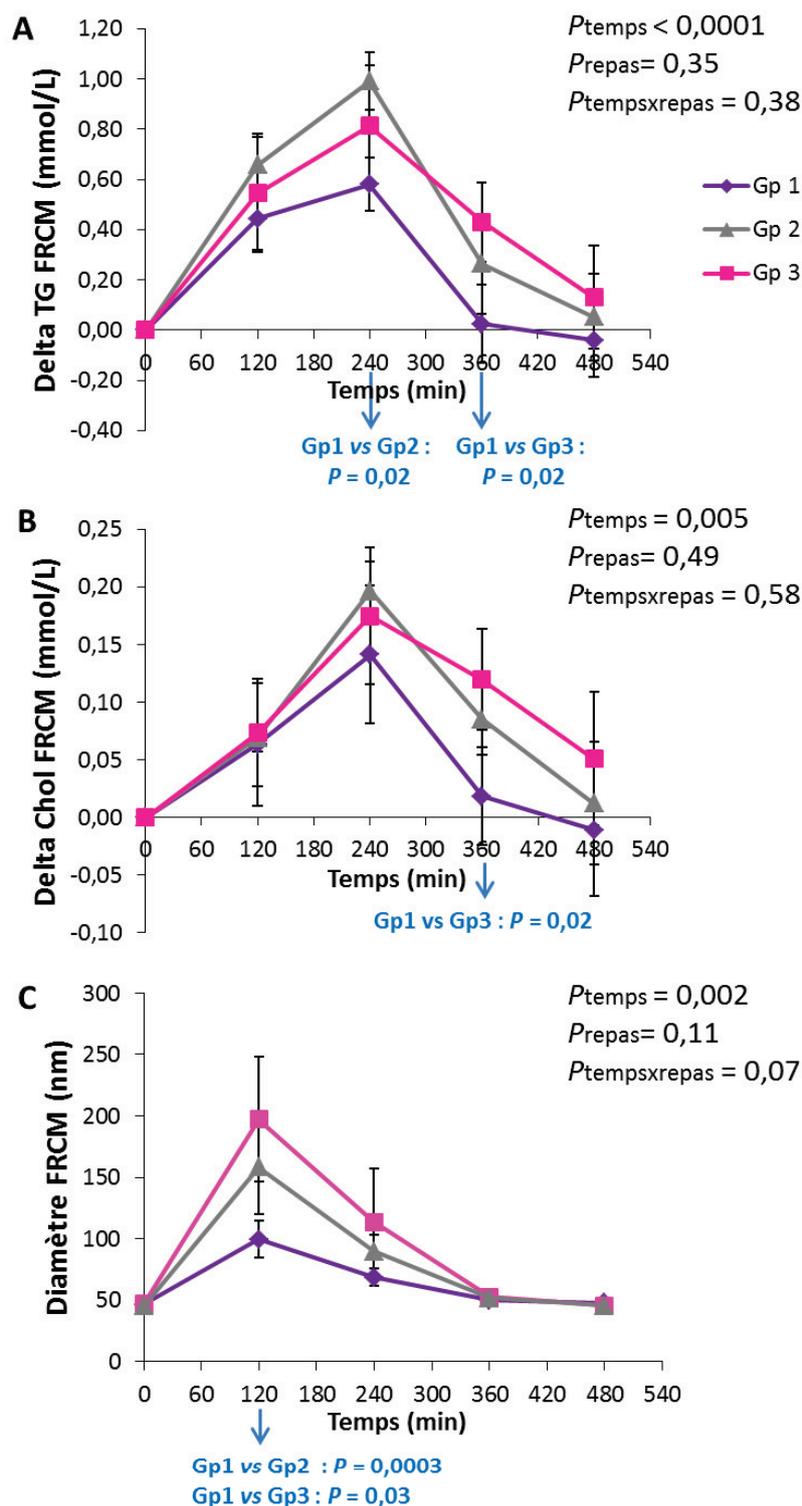


Figure 33 : Caractérisation de la fraction riche en chylomicron (FRCM) en phase postprandiale suite à l'ingestion d'un petit déjeuner enrichi en différentes teneurs de lipides laitiers. Concentration en triglycérides en mM (A), concentration en cholestérol en mM (B) et diamètre hydrodynamique des chylomicrons en nm (C), $n=4$ dans les groupes (Gp) 1, 2 et 3. Statistiques : Données normales et écart-types des différents groupes similaires. ANOVA à 2 facteurs avec mesures répétées suivi d'un test multiple post hoc de Tukey.

4 Discussion

Les LP laitiers modulent la cinétique de lipémie postprandiale, la structure et la composition des chylomicrons.

La présence des LP laitiers dans une émulsion lipidique a modulé la cinétique de lipémie postprandiale en comparaison avec des LP de soja chez la souris. Ainsi comparés aux LP de soja, les LP laitiers ont induit (i) 1 h après le gavage, plus de TG et d'AGNE plasmatiques et la sécrétion de CM plus petits contenant une quantité plus importante de SM et (ii) 4 h après le gavage, moins de TG et d'AGNE plasmatiques et la sécrétion de CM plus gros.

Dans l'étude clinique VALOBAB Digestion, réalisée sur des personnes iléostomisées, un effet de la teneur en LP laitiers (0, 3 ou 5 g) du produit fromager consommé a été observé sur la concentration en TG de la fraction riche en CM après la consommation du petit-déjeuner test. Le Produit 1 induisait une moindre concentration de TG dans ces CM au bout de 4 h en comparaison avec le Produit 2 et au bout de 6 h en comparaison avec le Produit 3. Concernant le diamètre des CM, un effet de la teneur en LP laitiers du produit fromager a été observé à 2 heures avec un diamètre plus petit suite au Produit 1 comparé aux Produits 2 et 3. Bien que l'aveugle ne soit pas encore levé, nous pouvons en conclure qu'il y aurait dans tous les cas un effet de l'enrichissement du produit avec des LP laitiers sur la taille et la quantité de TG des CM sécrétés.

Dans la littérature, peu d'études se sont intéressées aux effets des LP laitiers sur le métabolisme lipidique postprandial. Une seule étude clinique avait été réalisée sur des hommes sains dont la consommation d'une boisson contenant 2,8 g de LP laitiers dans un petit déjeuner hyper-lipidique n'avait pas mis en évidence d'effet des LP laitiers sur la lipémie postprandiale par rapport au même petit déjeuner contenant 2,8 g de LP d'œuf (Ohlsson, Burling, et al., 2010). Chez le rat, il a été montré qu'une émulsion contenant de la SM laitière diminuait l'absorption du cholestérol mais aussi la sécrétion d'AG totaux et de phospholipides dans la lymphe au cumulé sur 8 h, en comparaison avec une émulsion dépourvue de SM (Noh et al., 2004). Cet effet de la SM laitière semble cohérent avec les résultats obtenus à 4 h chez la souris où la lipémie est diminuée en présence de LP laitiers contenant de la SM par rapport aux LP de soja dépourvus de SM.

En revanche, l'étude sur modèle cellulaire présentée dans ce chapitre a montré que l'incubation pendant 24 h de micelles mixtes lipidique enrichies en SM sur les cellules Caco-2/TC7 tendait à induire la sécrétion d'une quantité plus importante de TG au pôle basal par les cellules en comparaison avec des micelles non enrichies en SM. Ce résultat semble plutôt en accord avec ceux obtenus à 1 h chez la souris. Il convient de souligner que dans ce modèle *in vitro*, les CM produits par les cellules ne subissent pas de lipolyse ni de clairance ; au contraire ils s'accumulent pendant toute

la durée de l'incubation. Il semble alors cohérent d'observer un effet similaire à celui retrouvé à 1 h chez la souris, reflétant la sécrétion des lipoprotéines et non leur élimination. Par ailleurs d'autres similitudes ont été observées entre les résultats obtenus à 1 h chez la souris avec les LP laitiers et sur les cellules avec la SM laitière : la sécrétion de chylomicron plus petits et la présence d'une proportion plus importante de SM. Cette concordance de résultats suggère que l'effet des LP laitiers sur la sécrétion des CM serait dû au moins en partie à leur richesse en SM.

Deux hypothèses peuvent être avancées concernant la présence d'une proportion plus élevée de SM dans les CM. Premièrement, les CM produits étant plus petits, la surface totale des CM est plus importante par unité de TG sécrétés. Étant donné que la SM se trouve à la surface des CM, sa plus forte concentration pourrait s'expliquer par l'augmentation du rapport surface/volume et non par l'augmentation de la quantité de SM par unité de surface de chaque chylomicron (Figure 34). En particulier chez la souris où suite à l'émulsion LP laitiers, les CM sont 1,4 fois plus petits et la concentration de SM par unité de TG sécrétés 1,9 fois plus importante ; ces ratios très proches suggèrent une contribution significative d'un effet de taille des CM à la différence de teneur en SM.

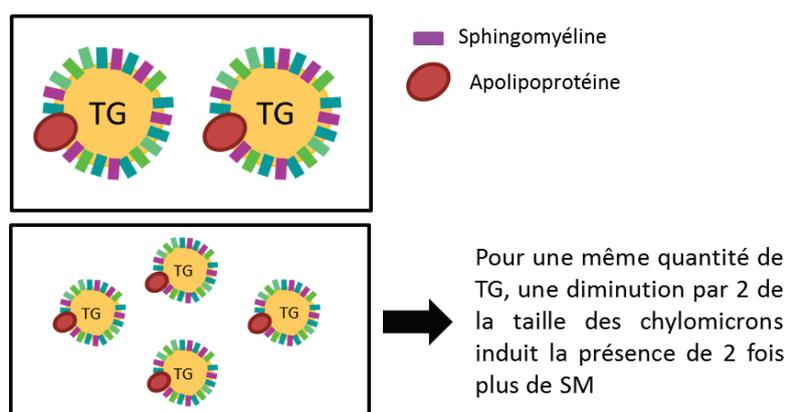


Figure 34 : Schéma de la relation théorique entre la taille des chylomicrons et leur concentration en sphingomyéline.

Deuxièmement, l'apport exogène de SM pourrait avoir contribué à la présence de SM dans les CM. Il est connu que la SM n'est pas absorbée intacte au niveau intestinal. Jusqu'à récemment, l'apparition dans la lymphe des céramides dérivés de l'hydrolyse intestinale de ces SM était décrite comme négligeable (Nilsson, 1968; Nilsson et al., 2006). Cependant, une étude récente a montré chez le rat que l'administration d'une émulsion contenant de la SM laitière conduit à l'apparition au niveau lymphatique d'espèces moléculaires de céramides similaires à celles observées lors de l'hydrolyse de la SM laitière administrée (Morifuji et al., 2015). Les auteurs suggèrent alors que des céramides issus de la dégradation de la SM auraient été absorbés intacts et sécrétés dans la lymphe. S'il semble donc peu probable que l'augmentation de la concentration en SM soit le résultat d'absorption de SM intactes, des études complémentaires sont nécessaires concernant la contribution de l'absorption de

céramides. Enfin, Nilsson et al. montrent chez le rat qu'une partie de la sphingosine issue de la digestion de la SM contribue à la formation de nouvelles molécules de SM retrouvées dans la lymphe (Nilsson, 1968). Notre étude du métabolisme de la SM par les cellules Caco-2/TC7 renforce cette hypothèse. En effet l'augmentation de l'expression de la SGMS2, enzyme catalysant la synthèse de SM à partir de céramide et de PC, et les différences de profil en espèces de SM sécrétées au pôle basal et dans les micelles incubées indiquent que l'apport exogène de SM stimulerait une synthèse endogène de SM par les cellules Caco2/TC7.

Par ailleurs, Morifugi et al. montrent qu'apporter la SM laitière dans un mélange de LP laitiers, plutôt que seule, provoque une meilleure absorption de celle-ci chez le rat, ce qui s'est traduit par des concentrations plus élevées des céramides dans la lymphe, notamment concernant les espèces moléculaires spécifiques du lait (Morifuji et al., 2015).

Chez l'Homme, il a été montré très récemment que les concentrations plasmatiques en LP peuvent être modulées pendant la période postprandiale et que cette modulation est différente suivant si les lipides du repas sont d'origine laitière ou de soja (Meikle et al., 2015). La concentration plasmatique en SM notamment est augmentée suite au repas laitier et diminuée suite au repas à base de soja par rapport aux valeurs à jeun. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de la concentration plasmatique en SM que nous avons observée à 1 h chez la souris ayant reçu l'émulsion à base de LP laitiers. Les auteurs suggèrent que les différences de réponses postprandiales observées pourraient être dues aux différences de composition en LP des repas mais aussi à la concentration initiale de chaque LP dans le plasma. Le dosage des glycérophospholipides et des sphingolipides plasmatiques au cours de la digestion d'un produit fromager plus ou moins enrichi en LP laitiers qui sera réalisé dans l'étude VALOBAB Digestion permettra de confirmer ce résultat chez l'Homme et de voir s'il existe un phénomène de dose réponse.

L'augmentation spécifique des concentrations plasmatiques de certains LP connus pour leurs effets santé, comme la SM et ses produits d'hydrolyse (céramides, sphingosine et sphingosine-1-phosphate ou S1P), pourrait être recherchée. La S1P, produit d'hydrolyse de la sphingosine, interagit avec les protéines plasmatiques et s'accumule dans les HDL. Des travaux de plus en plus nombreux indiquent que la S1P des HDL contribuerait de manière significative aux effets bénéfiques de ces lipoprotéines, notamment sur la vasorelaxation, la survie cellulaire et la synthèse d'oxyde nitrique et de prostacycline, deux molécules aux effets anti-athérogènes et anti-thrombotiques (Rodriguez et al., 2009).

Cependant des effets délétères des sphingolipides endogènes plasmatiques et cellulaires sont également connus. Ainsi, la concentration plasmatique en SM a été décrite comme un facteur indépendant de risque cardiovasculaire chez l'Homme (Jiang et al., 2000; Schlitt et al., 2006; Slotte,

2013). Chez l'animal, un régime athérogène est connu pour augmenter les taux de SM dans les lipoprotéines et la paroi artérielle (Jiang et al., 2000; Schlitt et al., 2006) . Parmi les mécanismes envisagés, l'interaction de la SM avec le cholestérol, qui pourrait entraîner la rétention de cholestérol dans les cellules et la paroi artérielle, a été proposée. Concernant le syndrome métabolique, il a été montré chez le primate non-humain que la consommation d'un régime riche en lipides et en fructose induisait une augmentation de la concentration plasmatique en céramides associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline. Enfin chez l'Homme, des taux plus élevés de SM à longues chaînes saturées (SM-18:0, -20:0, -22:0 et -24:0) ont été observées chez des sujets obèses en comparaison avec des sujets normopondérés (Hanamatsu et al., 2014). Les concentrations plasmatiques en SM totale et en différentes espèces moléculaires sont donc des paramètres importants à vérifier dans nos études sur l'impact métabolique des LP laitiers, notamment chez l'Homme. Une contribution différente de la synthèse endogène de sphingolipides d'une part, et des sphingolipides d'origine alimentaire d'autre part, à certains facteurs de risque cardiométabolique est possible et devra être élucidée.

Les LP laitiers modulent la digestion et l'absorption des lipides.

L'effet des LP laitiers sur la lipémie postprandiale pourrait provenir d'un effet modulateur des LP laitiers sur la digestion des lipides comme observé chez la souris et dans un modèle de digestion *in vitro*. En effet *in vitro*, les LP laitiers par rapport aux LP de soja n'ont pas modifié la lipolyse gastrique mais ont induit une lipolyse intestinale de l'émulsion plus importante. Parallèlement *in vivo*, l'intestin des souris gavées avec l'émulsion de LP laitiers contenait 1 h après le gavage plus de produits d'hydrolyse lipidique puis moins de ces produits d'hydrolyse à 2 h en comparaison avec l'émulsion de LP de soja ; cela indique également une digestion plus rapide. Nous émettons donc l'hypothèse qu'une accélération de la lipolyse intestinale en présence de LP laitiers aurait conduit à un afflux d'AG plus rapide aux cellules intestinales et donc à leur absorption et sécrétion dans la lymphe plus précocement en comparaison avec les LP de soja.

Il est important de souligner qu'une étude similaire parue très récemment rapporte des résultats contradictoires aux nôtres. En effet, Mathiassen et al. ont observé qu'une émulsion stabilisée avec des LP laitiers, en comparaison avec une émulsion stabilisée avec des LP de soja, subissait une plus forte lipolyse gastrique mais une plus faible lipolyse intestinale, en réalisant ces deux phases de digestion séparément (Mathiassen et al., 2015). Cependant lorsque ces auteurs ont réalisé la lipolyse intestinale à la suite de la lipolyse gastrique, comme nous l'avons fait, une plus forte lipolyse gastrique et intestinale avec l'émulsion stabilisée avec des LP laitiers a été observée. Comme le

soulignent Mathiassen et al. dans leur article, parmi les hypothèses pouvant expliquer ces résultats divergents, l'utilisation de différentes sources de TG comme phase lipidique dispersée semble la plus évidente. En effet, nous avons utilisé une fraction oléine de matière grasse laitière anhydre (MGLA), riche en acide oléique (18:1 *n*-9, AGMI), tandis que Mathiassen et al. ont utilisé de l'huile de maïs, riche en acide linoléique (18:2 *n*-6, AGPI). Cela suggère que les propriétés de la phase lipidique, notamment son degré de saturation, affecteraient l'activité des lipases. Ces auteurs suggèrent aussi des interactions entre la composition en TG du cœur hydrophobe et la composition en LP de la couche interfaciale recouvrant les gouttelettes lipidiques des émulsions, ce qui modulerait les propriétés et la capacité des lipases à exercer leur activité hydrolytique. L'existence de telles interactions n'a jamais été décrite à ce jour et reste donc à élucider.

Parallèlement aux modulations de la lipolyse intestinale, nous avons observé une augmentation de l'expression génique de MTTP dans le jéjunum au bout d'1 h et une diminution de l'expression d'ApoB dans le duodénum au bout de 4 h chez les souris gavées avec l'émulsion LP laitiers en comparaison avec les LP de soja. Dans les cellules Caco-2/TC7, l'incubation de micelles contenant de la SM a induit des modifications d'expressions géniques. Cependant celles-ci ne suivent pas celles observées chez la souris en présence de LP laitiers, avec notamment une tendance à la diminution de MTTP. La MTTP est connue pour réaliser le transfert des TG sur les particules naissantes de CM dans l'entérocyte. Une étude très récente montre que la MTTP serait également impliquée dans le transfert des SM et céramides sur les CM lors de leur formation (Iqbal et al., 2015). En effet les auteurs ont observé que (i) les concentrations plasmatiques en SM et céramides étaient diminuées chez les patients atteints d'abêtalipoprotéïnémie (déficiency en MTTP) et chez les souris *Mttp*^{-/-}, (ii) que la MTTP jouait un rôle important dans la sécrétion de ces sphingolipides mais pas dans leur synthèse, et (iii) que la MTTP était capable de les transférer d'une vésicule donneuse à une vésicule acceptante. La modulation de l'expression de MTTP par les LP et la SM laitiers dans nos études pourrait ainsi être expliquée par l'augmentation de la concentration intracellulaire en produits d'hydrolyse de la SM et par la synthèse endogène de SM à partir de ces produits, nécessitant une prise en charge par la MTTP qui serait alors régulée. L'obtention de résultats divergents concernant cette modulation peut provenir des nombreuses différences entre les modèles utilisés : *in vivo* chez la souris sur l'intestin entier et *in vitro* sur des cellules entérocytaires humaines. En effet, Homme et souris présentent des différences au niveau de leur métabolisme lipidique et un organe entier présente une réponse différente d'un modèle cellulaire simple.

En résumé chez la souris et en comparaison avec les LP de soja, les LP laitiers ont induit une cinétique de lipémie postprandiale plus précoce associée à une modulation de la digestion des lipides, via une augmentation de la lipolyse intestinale et des modifications d'expression de gènes du métabolisme lipidique dans l'intestin. De plus, les CM sécrétés durant le pic de lipémie sont plus petits et plus enrichis en SM suite aux LP laitiers. Ces effets seraient dus en partie à la teneur importante en SM des LP laitiers. De plus il a été mis en évidence *in vitro* que l'apport de SM alimentaire engendrait une synthèse endogène de SM par les entérocytes, ensuite intégrés aux CM et sécrétés dans la lymphe. La détermination des mécanismes d'action reliant les LP laitiers à leurs effets sur la lipolyse intestinale, l'absorption des lipidiqes et la synthèse de CM appellent à la réalisation de nouvelles études.

Chapitre 2 : Les lipides polaires du lait et du soja impactent différemment l'adiposité et l'inflammation, en association avec une modulation des cellules à gobelet du côlon, dans un régime hyper-lipidique chez la souris.

Résumé du chapitre 2

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons vu un impact différentiel des LP laitiers et de soja sur la lipémie postprandiale. Or la modulation de la lipémie postprandiale est connue pour impacter directement des phénomènes comme le stockage des lipides dans le tissu adipeux (TA) et l'inflammation. Ce phénomène transitoire peut donc avoir des conséquences métaboliques à long-terme comme l'expansion du TA et l'inflammation métabolique à bas bruit qui sont deux caractéristiques majeures de l'obésité (Jo et al., 2009; Weisberg et al., 2003). L'infiltration du TA par des macrophages et la sécrétion par ce tissu d'adipokines pro-inflammatoires contribuent au développement de l'inflammation à bas bruit (Maury et al., 2010). De plus, une altération de la barrière intestinale entraînant le passage de composés bactériens, les endotoxines, capables d'activer les voies de l'inflammation, a également été montrée (Cani et al., 2007). Récemment une étude réalisée chez la souris a montré que la consommation d'émulsifiants alimentaires synthétiques (le carboxyméthylcellulose et le polysorbate-80), utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour stabiliser les préparations lipidiques, conduisait à l'établissement d'un syndrome métabolique et d'une inflammation à bas bruit (Chassaing et al., 2015). Comme nous l'avons souligné, les LP sont également des émulsifiants d'origine naturelle largement utilisés par les industriels ; pourtant leur impact sur ces paramètres métaboliques est peu connu à ce jour.

Dans ce chapitre, nous avons testé l'hypothèse que l'incorporation dans un régime hyper-lipidique de LP issus du lait impacterait différemment la quantité et la structure du TA et les marqueurs de l'inflammation en comparaison avec des LP de soja, chez la souris. Compte tenu de nos précédents résultats montrant une modulation de la lipolyse digestive et de l'absorption intestinale selon le type de LP en phase postprandiale, nous avons également évalué l'impact des LP sur l'absorption des lipides et la composition de la barrière colique.

Pour cela quatre groupes de souris ont été nourris pendant huit semaines avec un régime normo-lipidique ou un régime hyper-lipidique sans LP (HF) ou contenant 1,2 % de LP laitiers (HF-MPL) ou de soja (HF-SPL). Les différents régimes hyper-lipidiques ont été formulés pour être isolipidiques (20 g/100 g de régime) et présenter des profils en AG similaires afin de mettre en exergue spécifiquement l'effet de l'incorporation de différentes classes de LP. Les résultats montrent qu'en comparaison avec le régime HF, le régime HF-SPL a induit une augmentation de la masse de TA blanc, sous la forme d'adipocytes plus nombreux et plus gros, et une augmentation de l'expression génique d'adipokines pro-inflammatoires (TNF- α , MCP1, leptine et LBP). Ces altérations ne sont pas observées avec le régime HF-MPL, malgré une prise alimentaire et une perte fécale en AG similaire ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de FATP4 et MTTP dans l'intestin, protéines

impliquées dans l'absorption lipidique. Par ailleurs le régime HF-MPL a induit une diminution de la concentration plasmatique de LBP (vs HF), protéine de transport des endotoxines, et de l'expression génique de CD68 dans le TA blanc (vs HF et HF-SPL), marqueur de l'infiltration macrophagique. Enfin, le régime HF-MPL a induit une augmentation du nombre de cellules à gobelet sécrétrices de mucus dans le côlon. Cet effet peut être dû à l'afflux observé d'AG spécifiques de la SM laitière dans les selles (22:0, 24:0, 22:4 n-6 vs HF et HF-SPL) et suggère une amélioration de la barrière intestinale pouvant protéger de l'inflammation.

En résumé, chez la souris la consommation quotidienne pendant huit semaines de LP de soja inclus dans un régime hyper-lipidique a induit l'expansion du TA blanc et l'augmentation de l'expression de marqueurs inflammatoires dans ce TA. Les LP laitiers n'ont pas induit ces altérations mais ont augmenté le nombre de cellules à gobelet dans le côlon et la perte fécale en AG spécifique de la SM laitière.

**Dietary emulsifiers from milk and soybean differently impact adiposity
and inflammation in association with modulation of
colonic goblet cells in high-fat fed mice**

Manon Lecomte¹, Leslie Couëdelo², Emmanuelle Meugnier³, Pascale Plaisancié¹,
Marion Létisse¹, Bérengère Benoit¹, Laure Gabert^{3,4}, Armelle Penhoat¹, Annie Durand¹,
Gaëlle Pineau¹, Florent Joffre², Alain Géoën¹, Carole Vaysse², Fabienne Laugerette¹,
and Marie-Caroline Michalski¹.

¹INRA, UMR1397, Université Lyon 1, INSERM U1060, INSA-Lyon, IMBL, CarMeN laboratory, F-69621 Villeurbanne, France ; ²ITERG-ENMS, Université de Bordeaux, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France ; ³INSERM U1060, INRA UMR1397, CarMeN laboratory, F-69921 Oullins, France ; ⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (CRNH-RA) and Centre Européen pour la Nutrition et la Santé (CENS), Pierre-Bénite, France.

Corresponding author: Dr Marie-Caroline Michalski, INRA, UMR1397, CarMeN laboratory, Bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE cedex, France.

Fax: +33 4 72 43 85 24

E-mail: marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr

Article accepté dans *Molecular Nutrition and Food Research* (Nov 2015)

Abstract

Scope: Enhanced adiposity and metabolic inflammation are major features of obesity that could be impacted by dietary emulsifiers. We investigated in high-fat fed mice the effects using a new polar lipid emulsifier from milk (MPL) instead of soybean lecithin (SPL) on adipose tissue and intestinal mucosa function.

Methods and results: Four groups of C57BL6 mice received for 8 weeks a low-fat diet (LF) or a high-fat diet devoid of polar lipids (HF) or a high-fat diet including MPL (HF-MPL) or SPL (HF-SPL). Compared with HF diet, HF-SPL diet increased white adipose tissue (WAT) mass ($P<0.05$), with larger adipocytes ($P<0.05$) and increased expression of MCP-1, LBP and leptin ($P<0.05$). This was not observed with HF-MPL diet despite similar dietary intakes and increased expression of FATP4 and MTPP, involved in lipid absorption, in upper intestine ($P<0.05$). HF-MPL mice had a lower expression in WAT of CD68, marker of macrophage infiltration, vs HF and HF-SPL mice ($P<0.05$), and more goblet cells in the colon ($P<0.05$).

Conclusions: Unlike SPL, MPL in a high fat diet did not induce WAT hypertrophy and inflammation but increased colonic goblet cells. This supports further clinical exploration of different sources of dietary emulsifiers in the frame of obesity outbreak.

Keywords: phospholipid, metabolic disease, gut barrier, feces, Caco-2.

Abbreviations: CD11c: cluster of differentiation 11c; CD68: cluster of differentiation 68; FA: fatty acid; FABP2: FA binding protein 2 ; FATP4: FA transport protein 4; HF: high-fat devoid of PL; HF-MPL: high-fat diet with MPL; SPL: high-fat diet with SPL; MPL: milk PL; LBP: lipopolysaccharide-binding protein; LF: low fat; LPS: lipopolysaccharides; MCP-1: monochemoattractant protein-1; MUC2: mucin 2; PL: polar lipid; SFA: saturated fatty acid; SM: sphingomyelin; SPL: soybean PL; TBP: TATA-box binding protein; TG: triglyceride; TNF- α : tumor necrosis factor alpha (TNF- α); WAT: white adipose tissue.

1 Introduction

Obesity has become a major public health issue as it is strongly associated with increased risk of diabetes and cardiovascular diseases. White adipose tissue (WAT) in obese individuals is composed of a greater number of adipocytes (hyperplasia) and an increase in the size of these adipocytes (hypertrophy) [1]. Recently, this exaggerated fat mass accumulation, notably as a result of hypercaloric diets with high fat content, has been associated with a low grade inflammation characterized by macrophage infiltration into WAT and elevated plasma levels of pro-inflammatory cytokines [2]. Beyond its energy storage capacity, WAT is an endocrine organ secreting multiple bioactive molecules known as adipokines, among which the monochemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), lipopolysaccharide binding protein (LBP), leptin and adiponectin [3, 4]. Dysregulated production or secretion of these adipokines, caused by WAT dysfunction and excess adiposity, contribute to the development of the obesity-associated low grade inflammation [4, 5]. Dietary fat absorption in the body is primarily governed by the small intestine whose lipid absorption capacity adapts to ingested fat amount. Genes known to play a significant role in intestinal fatty acid uptake and/or intracellular processing (FA transport protein [FATP4], FA binding protein [FABP2], adipose differentiation-related protein [ADFP]) and lipoprotein secretion (microsomal TG transfer protein [MTTP], secretion-associated, Ras-related GTPase 1 gene homolog B [Sar1b]) can be modulated by the quantity and quality of dietary fat in mouse [6, 7]. However, the consequences of differences in lipid absorption regarding WAT hypertrophy and hyperplasia remain poorly understood. Moreover, the intestine represents the front door for nutrient absorption and host defense. In this respect, recent studies have revealed that high fat diets cause intestinal disturbances affecting the gut barrier all along the digestive tract, from the small intestine to the colon [8]. This would further contribute to the onset of obesity by the expression of potential signaling molecules [9] and also to inflammation through the passage of proinflammatory bacterial compounds in plasma [10]. Notably, the colonic goblet cells that produce mucus are a major component of the gut barrier. Their number was reported to be regulated by fat amount and quality in the diet in rodent models. This was related to the presence of specific unabsorbed lipids in the gut lumen and a greater number of colonic goblet cells being associated with lower adiposity and inflammation [7, 11].

In processed food products, lipids need to be stabilized using emulsifiers. Recently, a mice study showed that two synthetic emulsifiers, carboxymethylcellulose and polysorbate-80, could induce metabolic syndrome and low-grade inflammation [12]. However, natural dietary emulsifiers such as polar lipids (PLs) are largely used by the food industry but less is known about their metabolic impact. Soybean lecithin (lecithin refers here to a mixture of PLs) represents 90% of the world total PL

emulsifier market [13]. Soybean lecithin was reported to decrease plasma and hepatic lipids [14-16], while others found increased plasma total cholesterol [17] or enhanced acute intestinal fatty acid absorption [18]. Most recently, tremendous interest is growing regarding milk polar lipids (MPLs) as an alternative PL source. MPLs originate from the natural milk fat globule membrane and thereby present a specific PL profile compared to soybean lecithin, including not only glycerophospholipids but also sphingomyelin (SM) [13]. The plasma cholesterol-lowering action of MPLs has been extensively studied [19] and linked to the ability of SM to inhibit intestinal cholesterol absorption [20, 21]. MPLs have also been shown to decrease hepatic lipids in rodents fed high fat diets [22-24]. Moreover, milk fat globule membrane consumption can protect mice from an increase in intestinal paracellular permeability (assessed by gavage with 4 kDa Dextran-FITC and measure of the resulting fluorescence in plasma) and inflammation induced by a proinflammatory challenge [25]. However, the long-term impact of milk vs soybean PL (SPL) emulsifiers on adiposity and inflammation has not been elucidated to date.

The aim of the present study was thus to test the hypothesis that MPLs incorporated in a high fat diet would differently impact adipose tissue amount and structure and markers of low grade inflammation in mice compared to soybean lecithin. We further tested the hypotheses that differential effects of milk and soybean PLs would be due to different impacts on intestinal absorption and colonic gut barrier.

2 Materials and methods

2.1 Materials and preparation of lipid mixture for the diets

The MPL ingredient was NZMP Phospholipid Concentrate 700 from Fonterra (Paris, France). Soybean lecithin was purchased from Atlantic Nature (Ploemeur, France). The FA profiles of both ingredients are available in Supporting Information Table S1. Palm oil was kindly provided by SIO (Bougival, France); colza, sunflower, and soybean oil were supplied by ITERG (Pessac, France). The different lipid blends were prepared at the lab scale by direct fat mixing, stored under N₂ at -20°C and sent to SAFE (Augy, France). The three HF diets contained the same amount of lipids, proteins and carbohydrates (**Table 9**). They differed only by the lack (HF diet) or the presence of 1.2 wt% of PLs from soybean (HF-SPL) or milk (HF-MPL). The oil composition was formulated to obtain similar FA profiles among the three high-fat diets (same proportion of SFA, MUFA and PUFA; **Table 10**)

2.2 Animals and diets

Male C57BL/6 mice (21–23 g and 6 weeks old; Janvier SA) were housed 5-6 per cage in a controlled environment (24 ± 1 °C and 12 h day–12 h light cycle) with free access to food and water. After a

week of chow diet, they were randomly divided into four groups and fed one of the following diets for 8-weeks: LF, HF, HF-SPL and HF-MPL diets. There were two cages per diet with 5 mice per cage for the LF diet (n=10), and 6 mice per cage for the HF, HF-SPL and HF-MPL diets (n=12). Body weight was measured weekly and food intake was measured twice a week (except for the LF group).

After 8 weeks, mice were euthanized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital and blood was collected by cardiac puncture on heparin-containing tubes. Plasma was obtained by centrifugation (4600 rpm, 5 min, 4°C) and stored (-80 °C). The small intestine was cut into three segments with length ratios of 1:3:2 (duodenum-jejunum-ileum). Livers, epididymal and retroperitoneal WAT and intestinal segments (duodenum and jejunum) were weighed, frozen in liquid N₂ and stored (-80 °C). One sample of duodenum and colon was fixed in an alcohol solution for immunohistochemistry analysis [26]. This protocol number N°CETIL 012014 was approved by the Animal Ethics Committee of INSA-Lyon and carried out in accordance with the EU Council Directive for the Care and Use of Laboratory Animals (no. 2010/63/EU).

2.3 Determination of fatty acid and phospholipid profile of the diets

Total lipids were extracted from diets and derived into FAME after addition of triheptadecanoyl glycerol (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) as a standard for GC analysis of FA profile as described in details previously [27]. Phospholipids of the diet lipid extracts were separated by preparative HPLC with a light-scattering detector as described previously [28].

2.4 Measurement of plasma lipids and LBP

The plasma concentrations of triglyceride (TG) and cholesterol were measured using the Triglyceride PAP kit (BioMérieux) and the Cholesterol RTU kit (Biomerieux) respectively. LBP plasma levels were assayed by ELISA kit (Enzo Life Sciences) according to the manufacturer's instructions.

2.5 Measurement of liver lipids and fecal fatty acid profile

Total lipids were extracted from liver by the Folch method. Phospholipids and TGs from liver lipid extracts were separated by preparative TLC, using hexane/diethyl-ether/acetic acid (80/20/1, by vol.) as a solvent. Diheptadecanoyl-glycero-phosphoethanolamine and triheptadecanoyl-glycerol were added as internal standards for the quantification of TGs and PLs, respectively. Feces FA profile was analyzed by GC after lipid extraction of grinded feces as previously described [11].

2.6 Real-time PCR assays

Total RNA was extracted from duodenum, jejunum and epididymal WAT of mice with the TRI Reagent (Ambion/Applied Biosystems). RNA concentration was measured with Nanodrop-ND1000 (Labtech) and RNA samples with A260/A280 ratio between 1.7 and 2.1 were considered of good quality. One microgram of RNA was used for target genes expression using RT-qPCR [29] (quantitative PCR conditions available upon request, emmanuelle.meugnier@pop.univ-lyon1.fr). Each assay was performed in duplicate, and validation of the realtime PCR runs was assessed by evaluation of the melting temperature of the products and by the slope and error obtained with the standard curve. TATAbox binding protein (TBP) expression in duodenum and epididymal WAT and 18S ribosomal RNA expression in the jejunum were used as internal standard for normalization of target mRNA expression. Data were expressed as fold change against the LF group.

2.7 Measurement of adipocyte size and number

Fresh tissue samples (50-80 mg) were rinsed with collidine buffer and fixed in collidine-HCL osmium tetroxide solution for at least 96h at room temperature. Samples were then rinsed with phosphate buffer saline for 24h, incubated with 8M urea for 48h, rinsed with phosphate buffer saline 0.01% Triton X-100 and filtered (400µm). The cell diameters were analyzed using a Multisizer-IV (Beckman Coulter, Villepinte, France) [30]. Cell sizes were in the range 20-240 µm. Size distributions were determined with >20000 cells per tissue; mode diameter and cell number were calculated as described previously [31].

2.8 Immunohistochemistry and quantitative analysis of intestinal goblet cells

Serial paraffin sections (4 µm) were rehydrated and prepared as previously described [26]. A rabbit polyclonal anti-mucin 2 (MUC2) (1/250; Santa Cruz (H300); Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) antibody was used. The intestinal epithelium was analyzed by assessing the number of goblet cells (MUC2 positive cells) per crypt-villus axis (duodenum) or per crypt.

2.9 Caco-2 cell culture and treatment

Caco-2 intestinal cells were grown as previously described [32]. Cells were seeded into 6-well plates ($3 \cdot 10^4$ cells/cm²) on Transwell filter inserts with 0.4 µm pores (Costar, Cambridge, MA), grown to confluence and used 21 days after seeding [29]. Mucins from porcine stomach (Sigma Aldrich, France, product No. M2378) were diluted in Phosphate Buffer Solution 1X at 25 mg/mL and then in

serum-free culture medium to prepare 4 solutions: 0; 5; 8; 16 mg of mucins/mL. After homogenization, 750µL of each solution were layered on cells. Each solutions were tested in three different wells, each analyzed in duplicate. After 12h, 750µL of serum-free culture medium containing micelles of ¹³C-oleic acid (Sigma, Saint-Louis, USA; 0.5 mM), prepared as described previously [29], were added in the apical chamber. Apical media were collected after 2 h and stored at -20°C. After addition of an internal standard (C17:0, heptadecanoic acid, 1mM), total lipids were directly methylated using hexane and the remaining amount of ¹³C-oleic acid in apical media was quantified by GC/C/IRMS (Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK) as previously described [33].

2.10 Statistical analysis

Data analyses were performed by using GraphPad Prism software (version 6.01). Normality of data was examined using the Kolmogorov-Smirnov test. Variance homogeneity was examined by using the Brown-Forsythe test. One-way ANOVA was performed on normal data, followed by a Tukey post-hoc test (when the variances were equal) or a Sidak-Holm post-hoc test (when the variances were unequal). For non-normal data, a Kruskal-Wallis test was performed followed by a Dunn post-hoc test. Differences were considered significant at the $P < 0.05$ level, whereas differences in which $0.05 < P < 0.1$ were considered tendencies. All data are presented as means \pm SEMs.

3 Results

3.1 PL composition of the experimental diets

As designed, the LF and HF diets contained only traces of PLs while the HF-SPL and HF-MPL contained sizeable amounts of PLs (Table 10). The difference of PLs quantity in this two diets corresponded mainly to the presence of SM in the HF-MPL diet (0.28 g/100 g of diet) while HF-SPL was nearly devoid of SM (0.02g/100 g of diet).

Table 9. Composition of the experimental diets

Ingredients (g/100g)	LF	HF	HF-SPL	HF-MPL
Lipid mixture	5	20	20	20
Among which:				
Palm oil	2	17.8	17.8	16.4
Rapeseed oil	1.5	-	-	-
Sunflower oil	-	0.8	1	1
Soybean oil	1.5	1.4	-	0.6
Polar lipid ingredients:				
Soybean (100% PL)	-	-	1.2	-
Milk (60% PL, 40% TG)	-	-	-	2
Corn starch	53.7	38.7	38.7	38.7
Casein	20	20	20	20
Saccharose	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5
Mineral mix	5	5	5	5
Vitamin mix	1	1	1	1
Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Energy content (kJ/g)	15.9	19.0	19.0	19.0
Energy (%)				
Proteins	21	17	17	17
Lipids	12	40	40	40
Carbohydrates	67	43	43	43

Table 10. Fatty acid profiles and polar lipid composition of the experimental diets.

FA profile (g/100 g fat)	LF	HF	HF-SPL	HF-MPL
10:0	0.1	<0.1	<0.1	0.1
12:0	0.2	0.2	0.2	0.2
14:0	0.8	1.0	1.0	1.2
15:0	0.1	0.1	0.1	0.1
16:0	22.9	40.0	40.9	40.2
16:1	0.2	0.2	0.2	0.3
17:1	0.1	0.1	0.1	0.1
18:0	4.0	4.1	4.0	4.5
18:1	39.7	38.6	38.8	38.4
18:2 (n-6)	24.0	14.2	13.2	12.8
18:3 (n-3)	6.3	0.7	0.7	0.9
20:0	0.4	0.4	0.3	0.4
20:1	0.5	0.2	0.1	0.2
22:0	0.2	0.1	0.1	0.1
22:1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
24:0	0.1	0.1	0.1	0.1
24:1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
SFA	28.7	45.9	46.7	46.8
MUFA	40.7	39.0	39.2	39.0
PUFA	30.3	14.9	13.9	13.7
LA/ALA ratio	3.8	19.7	17.8	14.5
Total FAs	93.5	99.0	97.1	93.2
PL composition (g/100 g of diet)				
PE	0.03	0.03	0.16	0.23
PI	<0.01	<0.01	0.11	0.03
PC	0.01	0.01	0.23	0.30
SM	0.01	0.01	0.02	0.28
LysoPC	0.03	0.02	0.04	0.04
PS	0.01	0.01	0.06	0.05
Total PLs	0.08	0.09	0.62	0.93

3.2 SPLs increase adiposity and liver lipids unlike MPLs

Estimated energy intake in high-fat groups is shown in **Table 11**. Energy intake in HF-SPL group was of 50 kJ/day/mice for one of the two cages, similar to HF and HF-MPL groups, and for the second cage somewhat higher (59 kJ/day/mice). Altogether, HF-SPL diet induced a greater body weight gain than HF diet ($P<0.05$) and HF-MPL diet ($P<0.01$) (**Table 11**). The HF-MPL diet did not induce greater body weight gain than the LF and HF diets. Total WAT mass and individual mass of epididymal and retroperitoneal WAT was higher in the HF-SPL group compared to the HF and HF-MPL groups

($P < 0.001$). As expected, LF group had a lower fecal lipid content compared to the high fat groups (**Table 11**; $P < 0.01$). However among high fat groups we observed no differences, with the seemingly lowest values actually observed for HF-MPL group.

Liver weight did not differ among groups. However, HF-SPL group had more hepatic lipids compared to the HF and HF-MPL group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). The HF-SPL group also had a greater proportion of hepatic TGs compared to the HF and HF-MPL groups ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) and a lower proportion of hepatic phospholipids compared to the HF group ($P < 0.05$). Altogether, the HF-MPL group did not differ from the HF group regarding liver lipids. No differences were observed among groups regarding plasma lipid concentrations (**Table 11**).

3.3 SPLs induce adipocyte hypertrophy and adipose tissue inflammation unlike MPLs

The size frequency distribution of epididymal adipocytes in HF-SPL group markedly shifted toward bigger sizes compared with the HF group (**Figure 35**), resulting in a larger mode diameter ($P < 0.01$) not observed in HF-MPL group (**Table 11**). In the retroperitoneal WAT, adipocytes of HF-SPL group were bigger than in other groups (**Figure 35**; $P < 0.05$). As shown in **Table 11**, HF-SPL group had a higher number of adipocytes in the epididymal and retroperitoneal WAT compared to all the other groups ($P < 0.05$). Thus HF-SPL mice presented a hypertrophy and hyperplasia of WAT adipocytes that was not observed in HF-MPL mice.

In epididymal WAT, parallel to adipogenesis, inflammation-associated genes, namely MCP-1, TNF- α and LBP were more expressed in the HF-SPL group than in HF and HF-MPL groups (**Figure 36A-B and G**, $P < 0.01$), while HF-MPL did not differ from the HF and LF groups. Gene expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 did not differ among groups (**Figure 36C**). Regarding gene expression of proteins present on macrophages (**Figure 36D-F**), cluster of differentiation 68 (CD68) was less expressed in HF-MPL group than in HF and HF-SPL groups ($P < 0.05$). Cluster of differentiation 11c (CD11c) and F4/80 were more expressed in HF-SPL group compared to HF-MPL group ($P < 0.01$). Regarding adipokines (**Figure 36H-I**), leptin was more expressed in the HF-SPL group compared to the other groups ($P < 0.001$). Adiponectin expression did not differ among groups. In addition, plasma LBP concentration was the lowest in HF-MPL group and significantly lower compared to HF group ($P < 0.05$; **Table 11**).

Table 11. Values of the morphological and metabolic parameters.

	LF		HF		HF-SPL		HF-MPL	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Initial body weight (g)	21.9	0.36	22.6	0.31	22.0	0.28	22.0	0.30
Final body weight (g)	25.4 ^a	0.53	28.8 ^{bc}	1.16	31.0 ^c	0.81	26.5 ^{ab}	0.51
Body weight gain (g)	3.5 ^a	0.69	6.2 ^a	1.31	9.0 ^b	0.71	4.5 ^a	0.67
Energy intake (kJ/day)	-	-	49	0.3	55	4.4	48	0.5
Total fatty acid content of dried feces (mg/ g of dried feces)	7.1 ^a	1.0	37.2 ^b	4.8	33 ^b	3.2	26.8 ^b	0.9
Total WAT mass (% of final body weight)	2.5 ^a	0.2	3.6 ^a	0.5	5.8 ^b	0.3	3.2 ^a	0.3
Epididymal WAT mass (g)	0.47 ^a	0.08	0.84 ^a	0.27	1.33 ^b	0.20	0.68 ^a	0.12
- Cell mode diameter (µm)	78.6 ^a	2.8	73.8 ^a	8.2	105.3 ^b	5.3	84.2 ^{ab}	5.7
- Number of cells (x 10 ⁶)	2.97 ^a	0.54	3.50 ^a	0.29	8.82 ^b	1.86	3.05 ^a	0.28
Retroperitoneal WAT mass (g)	0.16 ^a	0.03	0.26 ^a	0.09	0.48 ^b	0.05	0.19 ^a	0.05
- Cell mode diameter (µm)	75.5 ^a	4.1	70.9 ^a	10.9	109.3 ^b	4.0	74.9 ^a	4.2
- Number of cells (x 10 ⁶)	0.84 ^a	0.22	0.91 ^a	0.11	2.28 ^b	0.38	1.01 ^a	0.16
Liver mass (g)	1.09	0.03	1.09	0.04	1.05	0.02	1.01	0.02
Hepatic lipid (mg/g of liver)	3.78 ^a	0.33	12.41 ^b	0.89	16.28 ^c	0.69	13.69 ^b	0.60
Hepatic PLs (% of hepatic lipid)	11.8 ^{ab}	0.45	14.2 ^b	1.85	11.3 ^a	0.65	13.3 ^{ab}	0.77
Hepatic TGs (% of hepatic lipid)	75.2 ^{ab}	2.01	68.6 ^a	1.90	86.5 ^b	2.36	72.9 ^a	1.90
Plasma TGs (mmol/L)	0.6	0.1	0.6	0.1	0.7	0.0	0.7	0.1
Plasma cholesterol (mmol/L)	2.8	0.1	2.8	0.2	3.0	0.1	2.9	0.1
Plasma LBP (µg/mL)	22.7 ^{ab}	2.7	31.5 ^a	4.4	23.4 ^{ab}	4.8	16.7 ^b	1.2

^{a,b,c} Values in a row that share no common superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

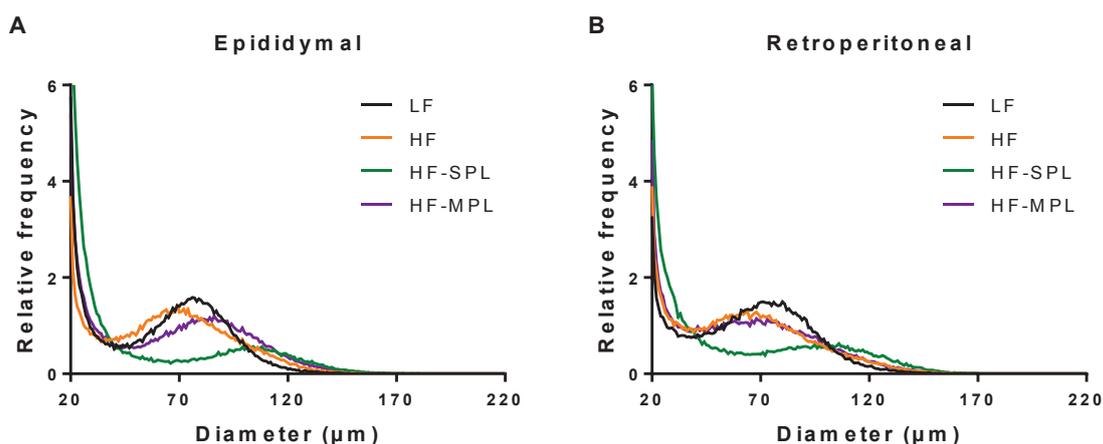


Figure 35 : Frequency distribution of adipocyte size in the epididymal (A) and retroperitoneal (B) WAT of mice. Curves represent the mean value for each group, n = 5. Labeled means without a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

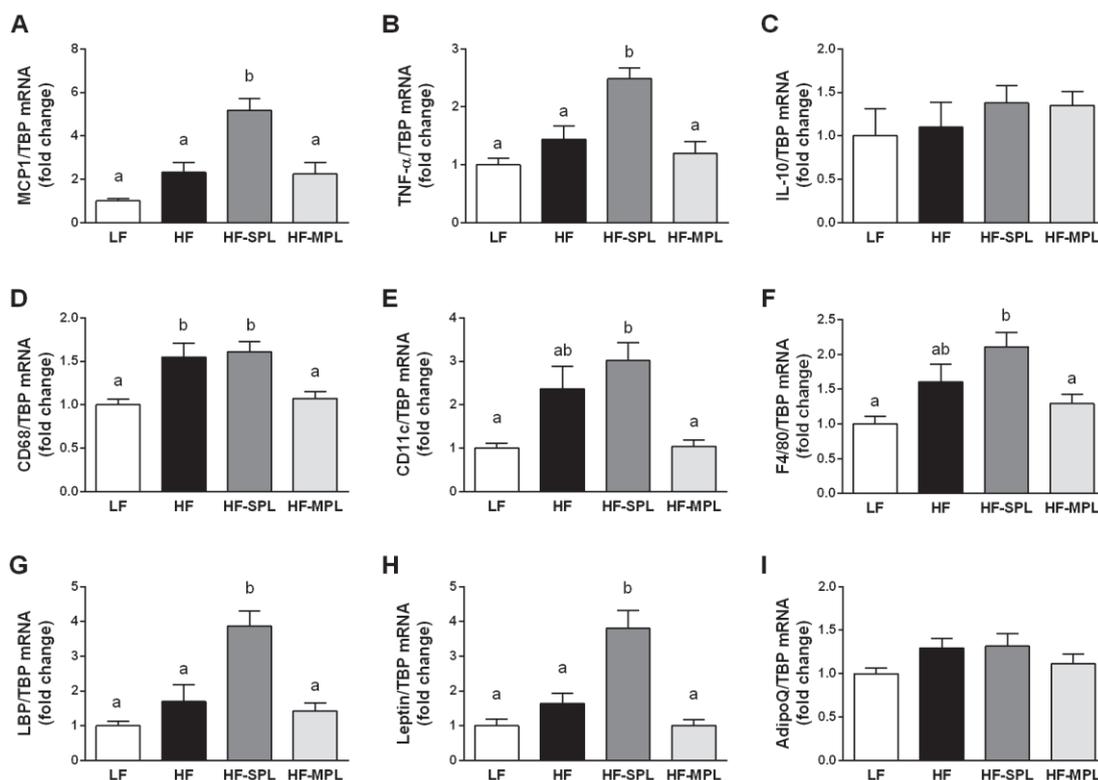


Figure 36 : Gene expression of inflammation markers in the epididymal WAT of mice. *Mcp1* (A), *Tnf- α* (B), *Il-10* (C), *Cd68* (D), *Cd11c* (E), *F4/80*(F), *Lbp* (G), *Leptin* (H) and *AdipoQ* (I) were quantified by RTqPCR in the epididymal WAT. Bars represent means \pm SEMs, $n = 6$. Values are normalized to the levels of *Tbp* mRNA and expressed as fold change against the LF group. Labeled means without a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

3.4 MPLs decrease duodenal mucus cells and enhance gene expressions related to lipid absorption

To evaluate if the differences observed in adiposity between HF-SPL and HF-MPL groups could be due to a different ability for fat absorption in the small intestine, we studied duodenal goblet cells, involved in the secretion of mucus layer, and the gene expression of lipid absorption-related proteins in the proximal small intestine. In the duodenum, HF and HF-SPL diets induced a higher number of mucus-producing goblet cells per crypt-villus axis than the LF and HF-MPL diets (**Figure 38A**; $P < 0.05$). To show whether this could contribute to different lipid absorption efficiency, we tested the uptake of ^{13}C -oleate in Caco-2 cells *in vitro* according to different concentrations of synthetic mucin gel on cells (**Figure 38B**). Mucins dose-dependently decreased the FA uptake by Caco-2 cells after 2 h of incubation ($P < 0.001$).

In the duodenum, we observed no differences among groups regarding the expression of FATP4 and FABP2 (**Figure 37A-B**). However in the jejunum, FATP4 and FABP2 were altogether more expressed in the HF-MPL group (**Figure 37F**). Regarding the gene expression of proteins involved in chylomicron production and secretion, HF-MPL group had altogether a higher expression of microsomal TG

transfer protein (MTTP) than the other groups (**Figure 37C and H**). HF-MPL group had a higher expression of the *Sar1b* compared to the HF group ($P<0.05$) in the duodenum; no differences were observed in the jejunum (**Figure 37D and I**). Regarding intracellular TG storage, ADFP or perilipin 2 was more expressed in HF-SPL and HF-MPL groups than in the HF and LF group in the duodenum (**Figure 37E-J**; $P<0.05$).

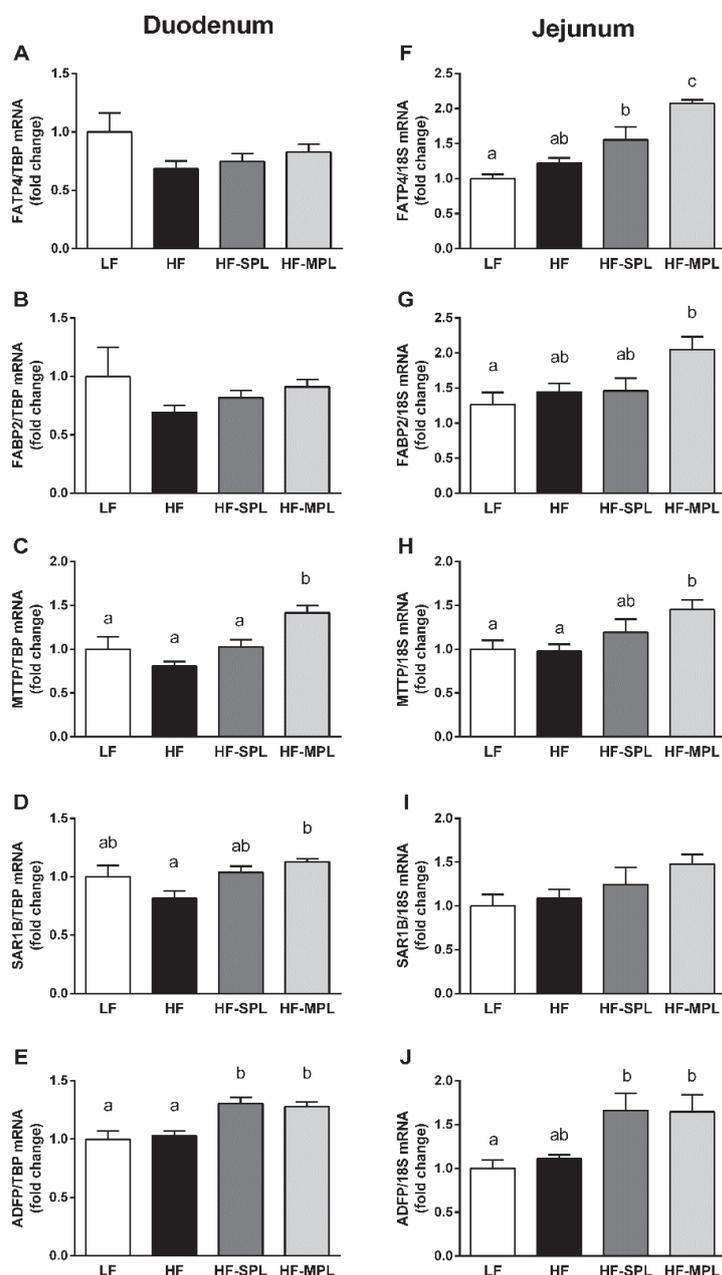


Figure 37 : Gene expression of lipid metabolism-related proteins in the small intestine of mice. *Fatp4*, *Fabp2*, *Mttp*, *Sar1b* and *Adfp* were quantified by RTqPCR in the duodenum (A-E) and in the jejunum (F-J). Bars represent means±SEMs, $n = 6$. Values are normalized to the levels of *Tbp* mRNA in the duodenum and of *18S* rDNA in the jejunum and expressed as fold change against the LF group. Labeled means without a common letter are significantly different ($P<0.05$).

3.5 MPLs increase colonic goblet cell number and fecal loss of fatty acids specific of SM

WAT inflammation can originate from LPS translocation from the gut due to altered colon barrier [34], notably in response to residual dietary lipids reaching the colon [35]. Therefore we studied one of the components of the gut barrier function by counting colonic goblet cells and evaluated FA fecal loss. HF-MPL induced a higher number of colonic goblet cells per crypt than HF-SPL and LF diet (**Figure 38C-D**; $P < 0.05$). The behenic (22:0) and lignoceric acids (24:0) specific of SM, and adrenic acid (22:4 n-6), were in higher proportion in the feces of HF-MPL group compared to the HF-SPL and HF groups (**Figure 38E**; **Supporting Information Table S2**).

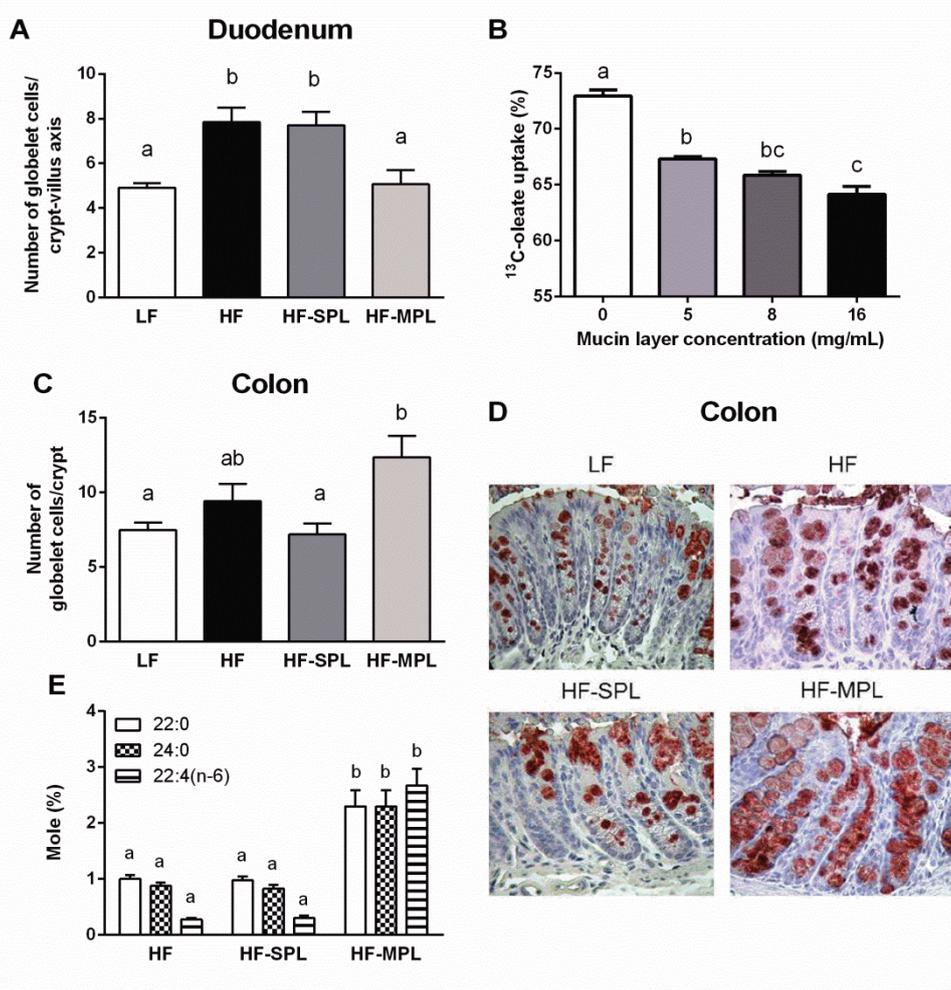


Figure 38 : Characterization of duodenal and colonic goblet cells number, fecal loss of very-long chain fatty acids in mice and impact of the mucus layer thickness on ¹³C oleic acid absorption by intestinal cells in vitro. (A) Goblet cells in duodenal epithelium (number of cells per crypt-villus axis), $n = 4-5$. (B) Cellular uptake of ¹³C oleic acid by Caco-2 cells with different mucin concentration added prior to addition of medium containing ¹³C oleate-enriched mixed lipid micelles, $n = 3$ per treatment (C) Goblet cells in colonic epithelium (number of cells per crypt), $n = 4-5$. (D) Thin section histology of LF, HF, HF-SPL, and HF-MPL mice colon (×40 magnification). Mucin 2 is immunolabeled in red. (E) Moles percentage of behenic (22:0), adrenic (22:4 n-6) and lignoceric acids (24:0) in the feces of mice after 7 weeks of diet were obtained by gas chromatography, $n = 4$. Bar represent means±SEMs. Labeled means without a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

4 Discussion

A recent study proposed that synthetic dietary emulsifiers induced low grade inflammation and metabolic syndrome in wild-type mice [12], which also raises the question of the impact of different sources of natural emulsifiers such as dietary PLs. In the present study, we investigated the effect of long-term consumption of a palm-oil based high fat diet supplemented with either MPLs or SPLs. Diets were designed to contain reasonable PL amounts according to reported PL dietary intakes in the range of 1-10% of total daily fat intake [36]. We show that unlike SPLs, MPLs did not induce adipose tissue hypertrophy and mRNA markers of inflammation, but increased colonic goblet cells associated with the fecal loss of SFA specific from MPLs.

HF-SPL induced greater body weight gain and WAT mass than HF and HF-MPL diets. In one cage of the HF-SPL group, mice consumed more diet but the metabolic parameters were similar in mice of both cages notably regarding WAT mass and related inflammation. Thus a higher energy intake in one cage of the HF-SPL group is unlikely to fully explain differences of weight gain and adiposity in all mice of this group. The impact of SPLs on the regulation of food intake would deserve further investigation.

HF-SPL diet also induced more hepatic lipids, including a higher proportion of TGs, than HF and HF-MPL diets. This finding is opposite to a lowering effect of soybean lecithin on liver lipids previously reported using a different HF diet based on sunflower oil instead of palm oil here [17]. In contrast, the HF-MPL diet did not increase liver lipids, which appears consistent with previously reported beneficial effects of MPLs on liver total lipids and TGs [22]. Altogether, MPLs did not induce lipid storage in the liver unlike SPLs. Of note, despite the higher content of PI and SM in HF-MPL vs HF-SPL diets, no effect of HF-MPL diet was observed in this study regarding plasma TGs and cholesterol, unlike previously reported cholesterol-lowering effects of both bovine PI [37] and milk SM [38, 39].

Because HF-SPL mice gained more adipose tissue than HF and HF-MPL mice, we hypothesized that the HF-SPL diet may have induced more intestinal fat absorption thereby leading to more fat storage than the HF and HF-MPL diets. We observed no differences among high fat-fed mice regarding total fatty acids excreted in feces, with the lowest values actually observed for HF-MPL mice. This suggests that HF-SPL diet might not have been more digestible than the others high-fat diets. Further studies using metabolic cages would be necessary to firmly confirm this issue. Additionally, high fat diets are generally reported to increase the expression of fatty acid transporters in the small intestine [6]. We therefore studied (i) the gene expression of intestinal lipid absorption-related proteins in the small intestine and (ii) the number of mucus-producing cells in the duodenum and (iii) tested *in vitro* the possible link between mucus amount and intestinal FA absorption.

The HF-MPL group had a higher expression of FATP4 compared to the HF-SPL and HF groups in the jejunum. FATP4 is a member of the fatty acid transport protein (FATP) family involved in cellular uptake and metabolism of long and very long chain fatty acids (VLC-FAs) [40]. Notably, the MPL ingredient brought some specific VLC-FAs with a higher proportion of 22:0, 23:0 and 24:0 acids than in the SPL ingredient. This may have triggered an increased expression of FATP4 in the HF-MPL group. Of note, the seemingly lower fecal lipid content in HF-MPL mice appears consistent with the higher genes expression of fatty acid transporters observed in these mice compared to HF mice. Following FA uptake by enterocytes, new TGs are synthesized and incorporated into chylomicrons that are secreted into the lymph. MTTP and SAR1b are two proteins playing a crucial role in this process and regulated by lipid intake [6]. We previously showed that compared with SPLs, MPLs promote more rapid digestive hydrolysis and intestinal lipid absorption in mice, associated with postprandial increase of MTTP expression [41]. Here MTTP and SAR1B were altogether more expressed in the upper intestine in HF-MPL group. This could be due to repeated enhanced postprandial exposure of lipolysis products on the small intestinal mucosa. Regarding intestinal cell lineage, we also reveal that HF-MPL diet induced a lower number of goblet cells in the duodenum compared to the HF and HF-SPL diets. Goblet cells are involved in the secretion of the mucus layer, which is a major actor of the gut physiology and homeostasis [42]. We demonstrate *in vitro* that the lower the mucin concentration, the more ¹³C oleic acid was taken up by Caco-2 cells. Therefore in the duodenum of HF-MPL mice, a faster absorption of FAs may have occurred, consistent with the above-discussed enhanced gene expression of proteins related to lipid absorption. Even if the duodenum is primarily involved in lipid digestion and the jejunum in lipid absorption, lipid absorption already begins in the duodenum [43].

Altogether, the higher adiposity observed in HF-SPL group is not likely to be due to a higher ability for fat absorption compared with HF and HF-MPL groups. In fact, we showed previously that an emulsion stabilized with MPLs rather than SPLs induced a sharper postprandial kinetics of TG and non-esterified FA (NEFA) [41], which can ultimately promote higher FA beta-oxidation [44]. We therefore suggest that a more favorable profile of postprandial lipemia using MPLs may have contributed to the lower storage of lipids both in the liver and WAT compared with SPLs.

Recent studies revealed that not only the mass but also the structure of WAT is an important determinant of its metabolic impact especially regarding inflammation [45]. For the first time to our knowledge, we show in mice that HF-MPL and HF diets induced similar adipocyte sizes and numbers whereas HF-SPL diet led to a higher number of larger adipocytes. The large adipocytes are implicated in the induction of pro-inflammatory genes such as TNF- α and MCP-1 [46], which were consistently increased in the HF-SPL group. We did not observe differences of expression of adiponectin, which

plays an important role as insulin sensitizing adipokine [47]. In turn, leptin level is known to be directly associated with WAT mass and inflammation [48], which can explain the observed increased expression of leptin in the HF-SPL group. A relationship was demonstrated between LPS translocation from the gut and obesity-induced adipose tissue dysfunction and inflammation [10]. LPS exert their inflammatory effect by being taken up by a specific transporter, LBP, which can be modulated by lipid quality in the diet [49]. Recent studies revealed that LBP is produced not only by the liver but also by the adipose tissue where its expression runs in parallel with lipid accumulation [4]. Furthermore, WAT-derived LBP can participate in LPS- and SFA-induced WAT inflammation [50]. The increased LBP expression in the WAT of HF-SPL mice might therefore be a contributor to the observed hypertrophy of their adipocytes and the parallel increased gene expression of inflammation markers. Altogether, HF-SPL group presented both features of obesity-induced adipose tissue dysfunction, namely hyperplasia and hypertrophy of adipocytes combined with infiltration by inflammatory cells [2, 5]. Conversely, the HF-MPL diet did not induce such adipose tissue dysfunctions. In fact, MPLs appeared to induce a specific effect by decreasing gene expression in the WAT of (i) CD68 and F4/80, marker of macrophage infiltration compared, (ii) CD11c, specific marker of the proinflammatory M1 macrophages, and (iii) by decreasing plasma LBP concentration. Underlying mechanisms deserve further investigation and studies including characterization of crown-like formations in WAT would now be necessary. A contribution of the slightly higher PC content of HF-MPL vs HF-SPL cannot be ruled out as anti-inflammatory properties of PC have been reported *in vitro* and *in vivo* [51, 52].

Gut barrier impairment, notably a decrease of intestinal paracellular permeability and tight junctions gene expression, have been observed in high-fat fed mice [53, 54]. This alteration of the gut barrier contribute to the passage of endotoxins into the circulatory system which further activate inflammation pathways [55]. A thin layer of colonic mucus associated with increased permeability is also observed in animal models of experimental colitis, allowing bacteria to enter into direct contact with the mucosa [56]. In line with this, a greater number of goblet cells, and a seemingly higher surface covered by goblet cells, were observed in the colon of HF-MPL group compared to other groups. We therefore hypothesize that more mucus could be secreted in the colon of HF-MPL mice. A stronger barrier in the colon can help to prevent the translocation of bacterial LPS that activate the polarization of macrophages into pro-inflammatory macrophages M1 [57]. Moreover, we previously showed in rodents that more numerous colonic goblet cells were associated with a lower adiposity and inflammation after high-fat diets [7]. We thus propose that the stronger colon barrier induced by MPLs via an increase of mucus-producing cells can have prevented high-fat induced macrophage infiltration of the WAT.

Residual free fatty acids reaching the colon can impact goblet cells. Notably palm oil in rat pups colon and palmitic acid in HT29-MTX cells increase the production of MUC2 and strengthen the intestinal barrier, conversely to PUFA-rich oils [11]. Because palmitate and PUFA contents were equalized in our three high-fat diets, we can rule out that differences between colonic goblet cell number would be due to these FA. However, our results suggest that in the colon of HF-MPL mice, the efflux of specific VLC-FAs (22:0, 24:0 and 22:4 n-6) may have impacted goblet cells. Milk-derived SM is known to be enriched in 22:0, and 24:0 while 22:4 n-6 is the elongation product of arachidonic acid (20:4 n-6), also known to be present in animal fat and breast milk. These 3 FAs are present in a higher proportion in the MPL compared to the SPL ingredient. Of note, SM is not absorbed intact by the enterocytes but first degraded into ceramides and further to sphingosines, mainly in the jejunum [58]. The differential impact of MPLs on goblet cells in the duodenum and the colon can thus be due to their different molecular forms during digestion. SM and its metabolites are also reported to be able to influence mucosal growth in the gut [58]. Altogether, our results suggest that the VLC-FA specific of MPL, either in free and/or esterified form in SM, could have specifically impacted goblet cell number.

In summary, incorporation of MPLs in the HF diet did not modify adiposity and liver lipids unlike SPLs that induced WAT hypertrophy and inflammation and hepatic steatosis. Among possible mechanisms for SPL-induced adiposity, we excluded the possibility of enhanced expression of intestinal lipid absorption proteins. MPL effects were associated with an improved gut barrier via increased goblet cells in the colon, possibly due to specific SM-derived lipids. This led ultimately to decreased macrophage infiltration markers in the WAT of MPL fed mice. The practical importance of these finding should not be underrated considering the wide use of polar lipid emulsifiers in the food and pharmaceutical industry. Further explorations will now be deserved in humans to evaluate the potential of using MPL ingredients more largely as a strategy to lower obesity-related metabolic inflammation.

Author's contribution

M. Lecomte, L.C., C.V., F.L. & M.C.M. designed research; M. Lecomte, L.C., E.M., P.P., M. Létisse, B.B., L.G., A.P., A.D., G.P., F.J., A.G., C.V., F.L. & M.C.M. conducted research; M. Lecomte, L.C., E.M., P.P., M. Létisse, B.B., L.G., F.J., A.G., C.V., F.L. & M.C.M. analyzed data; M. Lecomte, L.C., E.M., P.P., B.B., F.L., A.G., C.V., & M.C.M. wrote the paper. C.V. & M.C.M. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Manon Lecomte acknowledges funding of PhD thesis from Région Rhône-Alpes ARC1. Fabienne Laugurette acknowledges funding by Institut Carnot LISA and SFD. The funding bodies had no role in study design, data analysis nor decision to publish. We thank Corinne Malpuech-Brugère (Unité de Nutrition Humaine) for fruitful discussions. Daniel Kalnin (Philolao) is acknowledged for providing MPL ingredient. Robert Ward (Utah State University) is acknowledged for useful discussion and English language improvements.

Conflict of interest statement

M-C Michalski is the coordinator of a project aiming to study the valorization of milk polar lipids from buttermilk funded by the Agence National de la Recherche under reference ANR-11-ALID-007-01 (VALOBAB project) in which F.J. and M. Lecomte participate. M-C Michalski receives research funding from the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, French Dairy Board (CNIEL), Nutricia Research, and Sodiaal-Candia R&D and has consultancy activities for food and dairy companies. These activities have no link with the present study. Other authors have no conflict of interest to disclose.

Supporting Information Table S5. Fatty acid profile of the polar lipid ingredients.

FA profile (% of total FA)	SPL	MPL
12:0	0.00	0.98
14:0	0.08	5.17
14:1(n-5)	0.00	0.20
15:0	0.07	0.88
16:0 DMA	0.04	0.26
16:0 iso	0.00	0.21
16:0	21.19	22.99
16:1 <i>trans</i>	0.02	0.19
17 iso	0.04	0.31
16:1(n-9)	0.03	0.15
16:1(n-7)	0.16	1.36
18:0 DMA	0.02	0.13
17:1	0.05	0.34
18:1 DMA	0.00	0.08
18:0	2.77	10.29
18:1 <i>trans</i>	0.03	3.12
18:1(n-9)	16.38	30.84
18:1(n-7)	1.63	0.56
18:2 <i>trans trans</i>	0.00	0.37
18:2 <i>cis trans</i>	0.04	0.07
18:2 <i>trans cis</i>	0.00	0.33
18:2(n-6)	51.35	4.26
18:3(n-6)	0.01	0.06
18:3 <i>trans</i>	0.03	0.04
18:3(n-3)	4.88	1.62
20:0	0.13	0.28
20:1(n-9)	0.09	0.07
20:1(n-7)	0.01	0.07
20:2(n-9)	0.03	0.01
20:2(n-6)	0.06	0.26
20:3(n-9)	0.02	0.04
20:3(n-6)	0.00	0.46
20:4(n-6)	0.00	0.50
22:0	0.34	3.38
22:1(n-9)	0.00	0.03
20:5(n-3)	0.00	0.48
23:0	0.15	4.96
22:4(n-6)	0.00	0.06
24:0	0.24	3.22
24:1(n-9)	0.00	0.52
22:5(n-3)	0.08	0.77
22:6(n-3)	0.00	0.06

Supporting Information Table S2. Fatty acid profile of the feces of high-fat fed mice.

	HF		HF-SPL		HF-MPL	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
14:0	1.1 ^a	0.1	1.0 ^a	0.0	1.2 ^a	0.0
16:0	71.2 ^b	0.7	75.1 ^b	0.7	65.3 ^a	1.6
18:0	13.5 ^a	0.4	12.6 ^a	0.4	13.4 ^a	0.5
20:0	1.9 ^a	0.2	1.7 ^a	0.1	1.9 ^a	0.1
22:0	1.0 ^a	0.1	1.0 ^a	0.1	2.4 ^b	0.2
24:0	0.8 ^a	0.1	0.8 ^a	0.1	2.3 ^b	0.3
Other SFA	1.5 ^a	0.3	0.7 ^a	0.2	1.1 ^a	0.3
Total SFA	90.9 ^b	0.4	93.0 ^b	1.3	87.6 ^a	0.3
18:1 n-9	5.4 ^a	0.2	3.3 ^a	1.4	5.7 ^a	0.3
Other MUFA	1.0 ^a	0.1	1.3 ^a	0.2	1.1 ^a	0.1
Total MUFA	6.4 ^a	0.3	4.6 ^a	1.2	6.7 ^a	0.2
18:2 n-6	1.4 ^a	0.1	0.7 ^a	0.4	1.4 ^a	0.1
22:4 n-6	0.3 ^a	0.0	0.3 ^a	0.0	2.6 ^b	0.3
Other PUFA	1.0 ^a	0.2	1.3 ^a	0.3	1.6 ^a	0.1
Total PUFA	2.6 ^a	0.4	2.3 ^a	0.1	5.6 ^b	0.4

^{a,b} Values in a row that share no common superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

References

- [1] Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., *et al.*, Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 2009, 5, e1000324.
- [2] Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., *et al.*, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003, 112, 1796-1808.
- [3] Maury, E., Brichard, S. M., Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2010, 314, 1-16.
- [4] Moreno-Navarrete, J. M., Escote, X., Ortega, F., Serino, M., *et al.*, A role for adipocyte-derived lipopolysaccharide-binding protein in inflammation- and obesity-associated adipose tissue dysfunction. *Diabetologia* 2013, 56, 2524-2537.
- [5] Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., Walsh, K., Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011, 11, 85-97.
- [6] Petit, V., Arnould, L., Martin, P., Monnot, M. C., *et al.*, Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *Journal of lipid research* 2007, 48, 278-287.
- [7] Benoit, B., Plaisancie, P., Geloën, A., Estienne, M., *et al.*, Pasture v. standard dairy cream in high-fat diet-fed mice: improved metabolic outcomes and stronger intestinal barrier. *The British journal of nutrition* 2014, 112, 520-535.
- [8] Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G., Raybould, H. E., Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2015, 308, G840-G851.
- [9] de Wit, N. J., Bosch-Vermeulen, H., de Groot, P. J., Hooiveld, G. J., *et al.*, The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics* 2008, 1, 1755-8794.
- [10] Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., *et al.*, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007, 56, 1761-1772.
- [11] Benoit, B., Bruno, J., Kayal, F., Estienne, M., *et al.*, Saturated and Unsaturated Fatty Acids Differently Modulate Colonic Goblet Cells In Vitro and in Rat Pups. *The Journal of Nutrition* 2015, 145, 1754-1762.
- [12] Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., *et al.*, Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 2015, 519, 92-96.
- [13] Burling, H., Nilsson, A., Ohlsson, L., *Inform*, AOCS, Urbana, Illinois 2009, pp. 494-496.
- [14] Polichetti, E., Diaconescu, N., De La Porte, P. L., Malli, L., *et al.*, Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. *Br J Nutr* 1996, 75, 471-478.
- [15] Ide, T., Combined effect of sesamin and soybean phospholipid on hepatic fatty acid metabolism in rats. *J Clin Biochem Nutr* 2014, 54, 210-218.
- [16] Chang, J. H., Kim, M. S., Kim, T. W., Lee, S. S., Effects of soybean supplementation on blood glucose, plasma lipid levels, and erythrocyte antioxidant enzyme activity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr Res Pract* 2008, 2, 152-157.

- [17] LeBlanc, M. J., Brunet, S., Bouchard, G., Lamireau, T., *et al.*, Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. *J Nutr Biochem* 2003, *14*, 40-48.
- [18] Couedelo, L., Amara, S., Lecomte, M., Meugnier, E., *et al.*, Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. *Food & function* 2015, *6*, 1726-1735.
- [19] Castro-Gomez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F., Fontecha, J., Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2015, *101*, 41-51.
- [20] Noh, S. K., Koo, S. I., Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J. Nutr.* 2004, *134*, 2611-2616.
- [21] Ramprasath, V. R., Jones, P. J. H., Buckley, D. D., Woollett, L. A., Heubi, J. E., Effect of dietary sphingomyelin on absorption and fractional synthetic rate of cholesterol and serum lipid profile in humans. *Lipids Health Dis.* 2013, 12-125.
- [22] Wat, E., Tandy, S., Kapera, E., Kamili, A., *et al.*, Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 2009, *205*, 144-150.
- [23] Zhou, A. L., Hintze, K. J., Jimenez-Flores, R., Ward, R. E., Dietary fat composition influences tissue lipid profile and gene expression in Fischer-344 rats. *Lipids* 2012, *47*, 1119-1130.
- [24] Reis, M. G., Roy, N. C., Bermingham, E. N., Ryan, L., *et al.*, Impact of dietary dairy polar lipids on lipid metabolism of mice fed a high-fat diet. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013, *61*, 2729-2738.
- [25] Snow, D. R., Ward, R. E., Olsen, A., Jimenez-Flores, R., Hintze, K. J., Membrane-rich milk fat diet provides protection against gastrointestinal leakiness in mice treated with lipopolysaccharide. *J Dairy Sci* 2011, *94*, 2201-2212.
- [26] Plaisancie, P., Claustre, J., Estienne, M., Henry, G., *et al.*, A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *J Nutr Biochem* 2013, *24*, 213-221.
- [27] Couedelo, L., Boue-Vaysse, C., Fonseca, L., Montesinos, E., *et al.*, Lymphatic absorption of alpha-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br J Nutr* 2011, *105*, 1026-1035.
- [28] Leseigneur-Meynier, A., Gandemer, G., Marion, D., *Congrès International Chevreul pour l'Etude des Corps Gras*, ETIG, Paris 1989, pp. 311-318.
- [29] Vors, C., Capolino, P., Guerin, C., Meugnier, E., *et al.*, Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food Funct* 2012, *3*, 537-546.
- [30] Soula, H. A., Julienne, H., Soulage, C. O., Geloën, A., Modelling adipocytes size distribution. *J Theor Biol* 2013, *332*, 89-95.
- [31] Awada, M., Meynier, A., Soulage, C. O., Hadji, L., *et al.*, n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice. *Nutrition & Metabolism* 2013, *10*, 1-14.

- [32] Zoghbi, S., Trompette, A., Claustre, J., El Homsy, M., *et al.*, beta-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2006, 290, G1105-1113.
- [33] Gabert, L., Vors, C., Louche-Pelissier, C., Sauvinet, V., *et al.*, ¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-¹³C₃]tripalmitin and [1,1,1-¹³C₃]triolein. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011, 25, 2697-2703.
- [34] Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., Kim, D. H., High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One* 2012, 7, e47713.
- [35] Lam, Y. Y., Ha, C. W., Hoffmann, J. M., Oscarsson, J., *et al.*, Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity* 2015, 23, 1429-1439.
- [36] Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W. S., Tandy, S., Dietary Phospholipids and Intestinal Cholesterol Absorption. *Nutrients* 2010, 2, 116-127.
- [37] Burgess, J. W., Boucher, J., Neville, T. A., Rouillard, P., *et al.*, Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport and excretion. *Journal of lipid research* 2003, 44, 1355-1363.
- [38] Noh, S. K., Koo, S. I., Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *The Journal of nutrition* 2004, 134, 2611-2616.
- [39] Eckhardt, E. R., Wang, D. Q., Donovan, J. M., Carey, M. C., Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology* 2002, 122, 948-956.
- [40] Herrmann, T., Buchkremer, F., Gosch, I., Hall, A. M., *et al.*, Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene* 2001, 270, 31-40.
- [41] Lecomte, M., Bourlieu, C., Meugnier, E., Penhoat, A., *et al.*, Milk Polar Lipids Affect In Vitro Digestive Lipolysis and Postprandial Lipid Metabolism in Mice. *J Nutr* 2015, 145, 1770-1777.
- [42] Pelaseyed, T., Bergstrom, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., *et al.*, The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 2014, 260, 8-20.
- [43] Poirier, H., Degrace, P., Niot, I., Bernard, A., Besnard, P., Localization and Regulation of the Putative Membrane Fatty-Acid Transporter (FAT) in the Small Intestine. *European Journal of Biochemistry* 1996, 238, 368-373.
- [44] Vors, C., Pineau, G., Gabert, L., Draï, J., *et al.*, Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2013, 97, 23-36.
- [45] Alligier, M., Gabert, L., Meugnier, E., Lambert-Porcheron, S., *et al.*, Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013, 98, 802-810.
- [46] Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., Hauner, H., Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007, 92, 1023-1033.

- [47] Ohashi, K., Ouchi, N., Matsuzawa, Y., Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie* 2012, *94*, 2137-2142.
- [48] Otero, M., Lago, R., Gomez, R., Lago, F., *et al.*, Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine. *Drug news & perspectives* 2006, *19*, 21-26.
- [49] Laugerette, F., Furet, J. P., Debard, C., Daira, P., *et al.*, Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012, *302*, E374-E386.
- [50] Moreno-Navarrete, J. M., Escote, X., Ortega, F., Camps, M., *et al.*, Lipopolysaccharide binding protein is an adipokine involved in the resilience of the mouse adipocyte to inflammation. *Diabetologia* 2015, *58*, 2424-2434.
- [51] Treede, I., Braun, A., Sparla, R., Kuhnel, M., *et al.*, Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *The Journal of biological chemistry* 2007, *282*, 27155-27164.
- [52] Jung, Y. Y., Nam, Y., Park, Y. S., Lee, H. S., *et al.*, Protective effect of phosphatidylcholine on lipopolysaccharide-induced acute inflammation in multiple organ injury. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2013, *17*, 209-216.
- [53] Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio Mdo, C., Alfenas Rde, C., Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *The British journal of nutrition* 2012, *108*, 801-809.
- [54] Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G., Raybould, H. E., Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2015, *308*, G840-851.
- [55] Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., *et al.*, Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008, *57*, 1470-1481.
- [56] Johansson, M. E., Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014, *20*, 2124-2131.
- [57] Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008, *13*, 453-461.
- [58] Nilsson, A., Duan, R. D., Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *Journal of lipid research* 2006, *47*, 154-171.

Bilan et perspectives

L'épidémie de surpoids et d'obésité est principalement due à un déséquilibre de balance énergétique des individus, c'est-à-dire à un manque d'activité physique couplé à un excès d'apport calorique. Les lipides alimentaires sont ainsi souvent montrés du doigt du fait de leur apport énergétique élevé. Cependant, consommés en quantités recommandées, ce sont des nutriments indispensables au fonctionnement de notre organisme qui jouent également un rôle majeur sur les plans technologiques et sensoriels dans les aliments. De plus, les consommateurs sont plus que jamais dans l'attente d'aliments conciliant plaisir gustatif et bienfaits santé. Ainsi la stratégie de développement de produits à faible teneur en matière grasse, moins plaisants d'un point de vue gustatif, n'est pas suffisante et se révèle même inefficace comme récemment montré (D. K. Tobias et al., 2015). Il apparaît donc nécessaire d'identifier des sources d'ingrédients lipidiques capables d'avoir un impact bénéfique sur la santé, que ce soit par leur profil en acides gras ou par leur teneur en lipides mineurs bioactifs. Dans ce contexte, un intérêt croissant se développe autour des lipides polaires (LP) du lait dont plusieurs études soulignent qu'ils pourraient avoir des effets bénéfiques dans diverses pathologies dont le cancer colorectal, les désordres neurologiques et les maladies métaboliques et cardiovasculaires (Castro-Gomez et al., 2015; Cohn et al., 2008; Kullenberg et al., 2012). Parmi la diversité des produits laitiers, le babeurre est un coproduit de la fabrication du beurre qui a la particularité de contenir des quantités importantes de LP laitiers. A l'heure actuelle, le babeurre n'est pas valorisé en alimentation humaine. Or les LP laitiers, grâce à leurs propriétés amphiphiles, peuvent être utilisés dans la formulation des aliments, comme émulsifiants par exemple. De telles propriétés fonctionnelles sont aujourd'hui fournies dans les produits manufacturés par d'autres sources de LP, principalement la lécithine de soja (Burling et al., 2009). La controverse autour de la suprématie de ce dernier ingrédient en terme notamment de développement durable encourage une diversification des sources de LP dans les aliments.

Dans ce contexte général, notre objectif était d'identifier (i) l'impact de l'utilisation de LP laitiers comme émulsifiant sur la digestion, l'absorption et le métabolisme postprandial des lipides, et (ii) d'étudier l'impact à plus long terme de l'apport quotidien de LP laitiers sur le métabolisme lipidique, l'adiposité et l'inflammation du tissu adipeux. Nous avons également souhaité évaluer la spécificité des LP laitiers par rapport aux LP de soja, actuellement les plus consommés, sur l'ensemble de ces phénomènes. Un schéma faisant le bilan de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse est proposé à la fin de cette discussion (Figure 39).

L'impact des LP laitiers sur la lipémie postprandiale est lié à une modulation de la lipolyse intestinale et de l'absorption lipidique.

Chez la souris et en comparaison avec les LP de soja, les LP laitiers ont induit une cinétique de lipémie postprandiale plus précoce associée à une modulation de la digestion des lipides, notamment une augmentation de la lipolyse intestinale et des modifications d'expression de gènes du métabolisme lipidique dans l'intestin. La mise en parallèle des résultats obtenus dans un modèle de digestion *in vitro* et chez la souris nous a conduits à faire l'hypothèse que les différences de cinétique d'apparition des produits de lipolyse dans le contenu intestinal des souris seraient dues à une lipolyse intestinale différentielle selon le type de LP. Cependant l'effet des LP laitiers sur la vidange gastrique n'a pas été mesuré et ne peut donc pas être exclu. En effet, la plus forte lipolyse intestinale de l'émulsion avec les LP laitiers peut avoir entraînée un afflux plus important d'AG libres, connus pour ralentir la vidange gastrique. Des mesures de la cholécystokinine (CCK) ou encore du peptide glucagon-like peptide-1 (GLP1), tous deux reconnus comme inhibiteurs de la vidange gastrique (Chaudhri et al., 2006), permettraient de répondre à cette question dans les futures études.

L'étape initiale de prise en charge des micelles lipidiques postprandiales implique leur interaction avec le récepteur SR-BI, qui peut être modulée par la composition lipidique et la structure des micelles (Beaslas et al., 2009). Nous observons une plus forte expression génique de ce récepteur dans le duodénum des souris nourries avec le régime contenant des LP de soja (HF-SPL : $1,58 \pm 0,2$ vs HF : $1,0 \pm 0,1$, exprimé en variation par rapport à LF; $P < 0,05$) et une expression intermédiaire avec les LP laitiers ($1,2 \pm 0,1$). SR-BI a une forte affinité pour les glycérophospholipides anioniques tels que PS et PI (Rigotti et al., 1995). La plus forte teneur en PI et en PS des LP de soja en comparaison avec les LP laitiers a pu stimuler l'expression de SR-BI. Par ailleurs les différences de lipolyse ont pu entraîner la formation de micelles de composition et de taille différentes, modifiant ainsi leur interaction avec SR-BI. *In vitro*, l'ajout de SM dans des micelles induit une tendance à la diminution de l'expression de SR-BI. Cet effet est à confirmer par des mesures de l'interaction entre SR-BI et des micelles lipidiques plus ou moins enrichies en SM, par la technique de SPR (*surface plasmon resonance*) qui permet de mesurer les variations de vitesses d'association/dissociation d'une protéine et de son ligand. Par cette méthode, une étude récente montre que des concentrations croissantes de PC dans des micelles lipidiques diminuent l'interaction de SR-BI avec ces micelles (Goncalves et al., 2015).

Une lipémie postprandiale élevée et prolongée est associée au risque d'accident cardiovasculaire chez l'Homme (Nordestgaard et al., 2007; Zilversmit, 1995). L'accumulation dans la circulation des lipoprotéines riches en TG et de leurs résidus, qui peuvent s'enrichir en cholestérol et pénétrer la paroi des artères, permettrait le développement de la plaque d'athérome (Lopez-Miranda et al.,

2007; Vors et al., 2014). L'utilisation de LP laitiers comme émulsifiant augmente la lipémie de façon transitoire mais ne conduit pas à une accumulation dans la durée des lipoprotéines riches en TG et de leurs résidus. Au contraire ils favoriseraient une clairance plus rapide de ces lipoprotéines. Il faut cependant souligner que l'utilisation d'animaux différents à chaque temps postprandial n'a pas permis le calcul d'aire sous courbe des cinétiques de lipémie. Il n'est donc pas possible de déterminer si la quantité totale de lipides sécrétés sur l'ensemble de la digestion était similaire. Cependant les résultats dans leur ensemble suggèrent plutôt qu'une même quantité de lipides aurait été ingérée mais que leur digestion et leur re-sécrétion dans la circulation auraient été plus rapides avec les LP laitiers. L'utilisation d'émulsions contenant des traceurs lipidiques isotopiques sur des animaux canulés au niveau lymphatique pourrait permettre de suivre l'apparition des TG et de la SM alimentaire dans la lymphe et d'établir le pourcentage de traceurs absorbés et donc, par proportionnalité, le pourcentage d'absorption des lipides. D'autre part, l'utilisation de souris traitées avec un inhibiteur de la lipoprotéine lipase au niveau circulant permettrait de différencier les effets relatifs des LP laitiers sur la sécrétion des chylomicrons et sur leur clairance.

L'incorporation pendant huit semaines de 1,2% de LP laitiers ou de soja dans un régime à 20% de lipides chez la souris ne modifie pas la triglycéridémie et la cholestérolémie à jeun. Cela suggère que la modulation de la lipémie postprandiale et des propriétés des chylomicrons sécrétés n'a pas eu d'impact sur le métabolisme endogène des lipides à long terme. Cependant, dans les régimes administrés, les LP n'étaient pas spécifiquement structurés autour de gouttelettes d'émulsion comme lors des gavages. Il n'est pas à exclure que l'apport des LP sous cette forme n'ait pas eu le même impact sur la lipémie postprandiale pendant les régimes.

Comment expliquer l'absence d'effet hypolipémiant des LP dans notre étude ?

Les LP de soja induisent une augmentation des lipides hépatiques, une hyperplasie, une hypertrophie des adipocytes et une augmentation des marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux en comparaison avec un régime hyper-lipidique sans LP. Parmi les mécanismes envisagés pouvant expliquer cette hausse des lipides hépatiques et de l'adiposité avec les LP de soja, une plus forte digestibilité du régime et/ou une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans l'absorption des lipides ont été exclues. Les LP de soja ont légèrement augmenté la prise alimentaire dans l'une des deux cages du régime. Cependant les paramètres métaboliques étant similaires chez les souris des deux cages, notamment la prise de masse grasse et les marqueurs inflammatoires, cette augmentation de prise alimentaire ne semble pas pouvoir expliquer à elle seule ces phénomènes. De nouvelles études sont nécessaires afin de déterminer l'impact des LP de soja sur la

régulation de la prise alimentaire. Enfin, les LP de soja pourraient avoir modifié le devenir des lipides ingérés en favorisant leur stockage dans le tissu adipeux au détriment de leur beta-oxydation. En postprandial, une lipémie plus élevée est observée au bout de 4 h avec les LP de soja en comparaison avec les LP laitiers. Plusieurs études ont montré que lors d'un repas hyper-lipidique, la voie de l'oxydation des lipides n'est pratiquement pas stimulée ; les lipides exogènes sont donc préférentiellement orientés vers le stockage. En effet, nos cellules ne disposeraient pas de moyens efficaces pour stimuler l'oxydation lipidique à court terme (Beylot, 2008). La circulation prolongée d'une quantité plus importante de lipides, notamment d'AGNE, suite aux LP de soja a donc pu favoriser le stockage lipidique chez ces souris. Cependant il existe aussi des mécanismes de régulation à long terme via la modulation de l'expression des gènes de la lipogenèse (Beylot, 2008). Dans notre étude aucune modification des gènes de la lipogenèse n'a été observée dans le tissu adipeux des souris nourries avec les LP de soja. Le dosage de l'expression des gènes de l'oxydation dans le foie, le muscle et le tissu adipeux pourrait apporter un éclairage sur cette question. Dans les études futures, la réalisation de mesures de calorimétrie indirecte à l'aide de cages métaboliques permettrait de mesurer l'oxydation lipidique au niveau de l'organisme entier. Par ailleurs, l'utilisation conjointe de traceurs lipidiques permettrait de déterminer plus spécifiquement le devenir des TG ingérés (oxydation ou stockage) et l'existence d'une lipogenèse.

Plusieurs études réalisées sur des rongeurs ont montré que la consommation de lécithine de soja diminue les lipides plasmatique et hépatiques, notamment le cholestérol (Ide, 2014; X. Liu et al., 2013; Polichetti et al., 1996). Aucune modification d'adiposité n'a été observée dans ces études, pour une substitution d'une partie des TG par des LP de soja d'environ 5% dans un régime riche en lipides (Ide, 2014; LeBlanc et al., 2003; Polichetti et al., 1996) ; ou 1% dans un régime riche en lipides et en fructose (X. Liu et al., 2013). Ces résultats sont différents des nôtres où les LP de soja induisent une augmentation de l'adiposité et des lipides hépatiques. La durée du régime (8 semaines vs 1 à 4 semaines dans les études ci-dessus), la composition en acides gras des TG (principalement de l'huile de palme riche en AGS vs huiles riches en AGPI : huile de maïs pour Leblanc et al. ou huile tournesol pour Polichetti et al., Ide et al.) et la quantité de LP de soja administrée (1% vs 3,5%, Leblanc et al., ou 5%, Polichetti et al., Ide et al.) sont autant de pistes pouvant expliquer cette disparité de résultats. Par ailleurs, dans les études citées, les auteurs n'ont pas équilibré les profils en AG des différents régimes, la supplémentation avec des LP de soja conduit donc à une augmentation des AGPI dans le régime. Or les AGPI sont connus pour leurs effets protecteurs dans le développement des maladies métaboliques et cardiovasculaires. L'équilibrage des profils en AG des régimes que nous avons réalisé permet d'évaluer l'effet des LP en tant que molécules bioactives et non comme vecteurs alimentaires d'AGPI. Une autre étude récente montre que la substitution de 4,5% des lipides avec de la lécithine

de soja (soit ~1% de LP) ne modifie pas la prise de poids, les lipides plasmatiques ni la perte fécale en lipides totaux chez le rat soumis à un régime contenant 15 % d'huile de palme pendant 9 jours (Sadouki et al., 2014). Les résultats de cette étude réalisée dans des conditions proches des nôtres en terme de quantité de LP et de type et de quantité d'huile utilisée dans le régime concordent avec ce que nous observons au bout de huit semaines au niveau de l'absorption lipidique et de la lipémie à jeun. Il convient donc de ne pas généraliser la portée des résultats sur les effets des LP et de poursuivre l'étude de leurs effets dans le cadre de régimes variant par la quantité et la composition des lipides.

Chez l'Homme, des études rapportent également des effets contradictoires de la lécithine de soja sur la lipémie (Davies et al., 1959; Morrison, 1958; Steiner et al., 1944; Tompkins et al., 1980). L'une des études les plus récentes, réalisée sur des hommes ayant une hyperlipémie, ne montre pas d'effet de la supplémentation de 20 g de lécithine de soja par jour pendant 4 semaines sur les lipides et les lipoprotéines plasmatiques (Oosthuizen et al., 1998). Par ailleurs, certains composants ou dérivés de la lécithine de soja pourraient aboutir à des effets délétères. La choline issue de la dégradation de la PC, principal LP de la lécithine de soja, peut être convertie par le microbiote en triméthylamine (TMA), un gaz entièrement absorbé qui est ensuite oxydé en TMAO (oxyde de TMA) dans le foie. Une supplémentation en TMAO ou en choline dans le régime induit le développement des plaques d'athérome chez la souris. Chez l'Homme, des taux élevés de TMAO et de choline plasmatique sont associés à un risque cardiovasculaire accru (Wang Nature 2011). Enfin, la lécithine de soja contient des phyto-œstrogènes qui présentent une structure chimique proche de celle de l'œstradiol et dont le rôle n'est pas encore clarifié dans le développement de certains cancers notamment du sein. Ainsi, plusieurs méta-analyses n'indiquent pas d'effets délétères des phyto-œstrogènes mais au contraire un effet protecteur sur une population de femmes asiatiques (Chen et al., 2014; Fritz et al., 2013). Cependant chez le rongeurs, les phyto-œstrogènes favoriseraient la prolifération et la croissance de tumeurs mammaires hormonodépendantes (Afssa et al., 2005).

Concernant les LP laitiers, la littérature rapporte également un effet hypolipémiant notamment au niveau hépatique (Kamili et al., 2010; Reis et al., 2013; Wat et al., 2009; Watanabe et al., 2011). Nous n'avons pas observé cet effet dans notre étude. La qualité des lipides présents dans le régime a pu jouer un rôle dans ces différences d'effets observés. En effet, dans notre étude les lipides proviennent principalement d'huile de palme tandis que dans les deux études réalisées par l'équipe de Jeffrey Cohn, ils proviennent de matière grasse laitière (MGL) spécialement enrichie en cholestérol. Ce régime qualifié de «Western fast food diet» par le fournisseur, a été formulé pour favoriser le développement de lésions athérogènes chez des souches de souris susceptibles à l'athérosclérose. Ce régime a donc pu favoriser la cholestérolémie, provoquant des effets importants

sur le foie chez les souris, et favorisant la probabilité d'observer un effet favorable de la supplémentation avec des LP laitiers. D'autre part, l'équipe de Jeffrey Cohn n'utilise pas un extrait de LP laitiers purifié mais un concentré de MFGM incluant, en plus des LP, des protéines lactières (notamment celles de la MFGM) ainsi qu'un certain niveau de structuration de l'ensemble en fragments de membrane biologique. Il n'est pas à exclure que certains effets observés par ces auteurs soient dus à ces éléments de composition et de structure.

Perspectives d'études de l'impact des LP laitiers sur la barrière intestinale.

Les LP laitiers ont également induit une diminution de la concentration plasmatique de LBP et de l'expression génique de marqueurs de l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux. De plus, une augmentation du nombre de cellules à gobelet sécrétrice du mucus dans le côlon avec les LP laitiers suggère que ces souris avaient une barrière intestinale renforcée. Cette modulation des cellules à gobelet pourrait être due à l'afflux d'AGS à très longues chaînes spécifiques de la SM lactière au niveau du côlon. Nous faisons l'hypothèse que l'apport de LP laitiers pendant 8 semaines aurait engendré un gel de mucus plus épais dans le côlon, diminuant alors le passage dans la circulation de LPS, connus comme un acteur important activant les voies de l'inflammation et le changement de phénotype des macrophages M2 en macrophages M1 pro-inflammatoire dans le tissu adipeux.

Parmi les perspectives envisagées à ces travaux, l'étude de l'impact des LP laitiers sur le microbiote intestinal nous paraît indispensable. En effet une étude très récente établit un lien direct entre une diminution de l'espèce *Akkermansia muciniphila* dans le microbiote et une augmentation de l'adiposité et de l'inflammation dans le tissu adipeux chez la souris (Schneeberger et al., 2015). *Akkermansia muciniphila* utilise le gel de mucus comme source d'énergie et il a été montré que l'ajout d'*Akkermansia muciniphila* dans un régime hyper-lipidique permet de restaurer l'épaisseur du gel de mucus, originellement altérée. Ces résultats nous amènent à nous demander si les effets des LP laitiers sur le nombre des cellules à gobelet pourraient passer par une augmentation d'*Akkermansia muciniphila* dans le microbiote intestinal.

D'autre part, il a été montré que les AG peuvent avoir un effet direct sur les cellules à gobelet. Ainsi l'huile de palme, riche en AGS à longues chaînes facilement libérés sous forme libre au cours de la digestion, augmente la surface des cellules à gobelet, se traduisant par une augmentation de la production de MUC2, et diminue la perméabilité paracellulaire colique (Benoit et al., 2015). De plus, les LP pourraient également moduler les propriétés du gel de mucus. En effet, la PC est l'un des

éléments constitutifs du gel de mucus et une réduction importante de la teneur en PC du mucus est observée dans le côlon de patients atteints de rectocolique hémorragique (Stremmel et al., 2012). Plusieurs études chez l'Homme montrent un effet bénéfique de l'administration orale de PC sur des patients atteints de RCH (Stremmel et al., 2012). Au vu de ces résultats et de nos observations, des études *in vitro* et *in vivo* seraient à mener afin de déterminer les mécanismes d'action par lesquels la SM et ses produits d'hydrolyse, notamment les AGS à très longues chaînes, agissent sur les cellules à gobelet et donc la production de mucus par celles-ci.

Si le gel de mucus est un acteur majeur dans la fonction barrière intestinale, il n'est pas le seul. Les protéines de jonctions que sont les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées jouent un rôle très important. Les jonctions serrées sont notamment responsables de la régulation de la perméabilité paracellulaire (Nusrat et al., 2000). Ces sont des complexes multiprotéiques, comportant des protéines transmembranaires de la famille des claudines, occludines et JAM (junctional adhesion molecules) auxquelles sont reliées des protéines intracellulaires (zonula occludens ou ZO). L'ensemble de ces protéines pourrait avoir été impacté par les LP laitiers ; des mesures d'expression protéique et génique ainsi que des tests de perméabilité paracellulaire permettraient de répondre à cette question dans les futures études.

Des études portant sur l'interaction des membranes cellulaires avec le LPS ont montré que ce dernier avait plus d'affinité pour les domaines membranaires riches en SM et cholestérol en comparaison avec une bicouche de PC (Ciesielski et al., 2013). D'autre part, la neutralisation des LPS par les HDL correspond à leur incorporation dans l'interface phospholipidique. Or des études *in vitro* suggèrent que la neutralisation des LPS par des vésicules de LP en présence de LBP et sCD14 est plus ou moins efficace selon la classe de LP ; la SM faisant partie des LP neutralisants (Wurfel et al., 1997). Ainsi l'existence d'interactions SM-LPS, directes ou via le cholestérol, dans la lumière du tube digestif n'est pas à exclure et pourrait favoriser l'excrétion fécale du LPS, diminuant ainsi son absorption intestinale. L'existence de telles interactions dans l'intestin reste à élucider.

Dans nos travaux, nous observons un impact des LP, laitiers ou de soja, à plusieurs niveaux dans l'organisme : intestin grêle, côlon, plasma, tissu adipeux et foie. Une approche plus globale par des études de métabolomique pourrait permettre de mieux caractériser leur impact au niveau de l'organisme. La métabolomique consiste en l'analyse d'une quantité très importante de métabolites d'un tissu ou d'un fluide biologique permettant ainsi l'acquisition de profils métaboliques complexes et leur comparaison par analyses statistiques multivariées. Elle est considérée comme une approche prometteuse notamment dans le domaine de la nutrition (Ferrara et al., 2012). Par exemple, une récente étude métabolomique a permis de mettre en évidence que la consommation d'un beurre appauvri en cholestérol et en AGS induisait un état général moins athérogène en comparaison avec

un beurre classique chez le hamster (Martin et al., 2015). L'utilisation de cette approche pour élucider de manière plus globale les effets des LP alimentaires serait donc intéressante à envisager.

Intérêt de nos travaux d'un point de vue nutritionnel : quelles perspectives pour les LP laitiers ?

D'après une enquête de l'Insee publiée en 2012, les Français passent moins de temps en cuisine qu'en 1986 et privilégient désormais les plats préparés aux produits frais (Nabli et al., 2012). D'autre part, une étude détaillée des apports en AG de la population française publiée par Terres Univia en début d'année, à partir des données brutes de l'étude de consommation alimentaire INCA 2 réalisée en 2007, met en avant la contribution des différents groupes d'aliments aux apports alimentaires en acides gras (Tressou-Cosmao et al., 2015). On retrouve parmi les principaux contributeurs de la consommation en AGS, la catégorie des « pâtisserie et gâteaux » et parmi les principaux contributeurs de la consommation en AGPI, celles des « condiments et sauces » et « plats composés ». Ces trois catégories regroupent des produits formulés, fortement susceptibles de contenir des LP. La consommation importante de ces produits et leur contribution aux apports en AG totaux dans la population française renforcent l'intérêt de connaître l'effet des LP retrouvés dans ces produits.

Les effets sur la santé de la lécithine de soja, actuellement la source commerciale de LP la plus utilisée, restent débattus. Plus généralement, le soja duquel elle est extraite fait également le sujet de nombreuses controverses concernant la déforestation engendrée par sa culture, notamment en Amérique du Sud, et l'utilisation d'OGM (organismes génétiquement modifiés). Enfin les procédures d'extraction des LP du soja font appel à des solvants pouvant présenter un risque pour l'environnement.

Les LP laitiers se trouvent en quantité importante dans le babeurre, co-produit de l'industrie laitière obtenu lors de la préparation du beurre à partir de la crème. Trente-deux tonnes de babeurre ont été produites en France en 2008 (source : CNIEL). Cependant ce produit n'est actuellement pas valorisé dans l'alimentation humaine. Il est séché sous la forme d'une poudre utilisée ensuite à 90% dans l'alimentation du bétail. Le babeurre est donc produit en quantité importante, localement, et l'obtention d'ingrédients riches en LP laitiers à partir de ce babeurre peut être réalisée par procédures de micro- et ultra-filtration, n'impliquant pas l'utilisation de solvants. D'un point de vue des effets sur la santé, nos résultats et ceux de la littérature sont encourageants bien qu'il ne soit pas encore possible de conclure définitivement à un effet protecteur des LP laitiers contre certains facteurs de risque cardiométabolique. La poursuite d'études de la consommation chez l'Homme de

LP laitiers en aigu et sur le long terme dans des situations réalistes (LP laitiers inclus dans un produit potentiellement commercialisable, consommation au cours d'un repas complexe, etc.) est nécessaire. Les résultats de l'étude d'intervention nutritionnelle en cours dans le cadre du projet ANR VALOBAB pourront fournir de nouveaux éléments dans ce contexte.

D'un point de vue pratique, l'application des Apports Nutritionnels Conseillés implique de varier les sources de matière grasse dans notre alimentation dans le but de couvrir nos besoins en différents AG. Dans cette optique d'équilibre et de diversification et dans une approche durable, l'utilisation de plusieurs sources de LP dans la formulation des aliments serait une évolution bénéfique d'un point de vue nutritionnel mais aussi d'un point de vue environnemental.



Crédit photos et montage : M. Lecomte

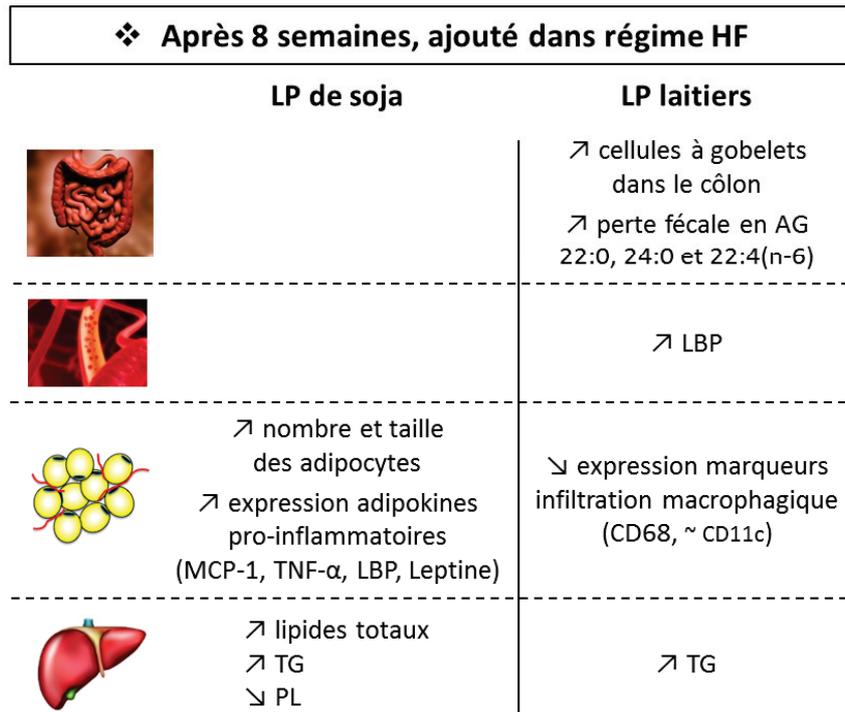
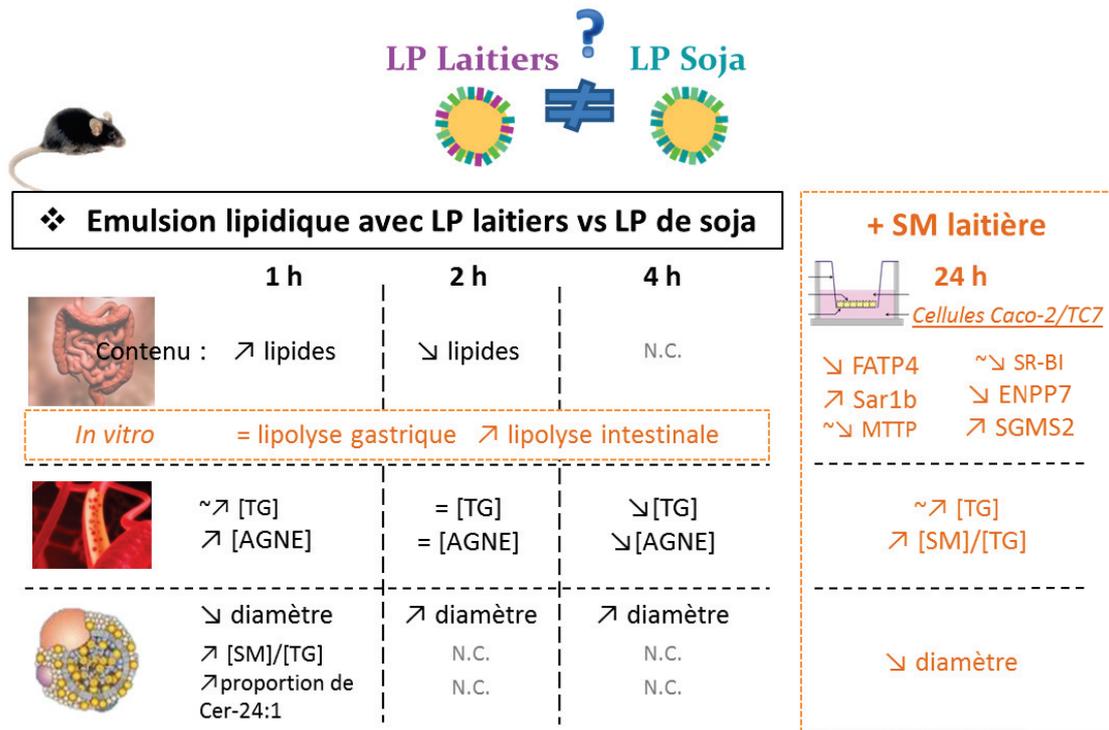


Figure 39 : Schéma récapitulant les principaux résultats des travaux réalisés. N.C., Non Connu ; ↗, augmentation ; ↘, diminution ; ~, tendance.

Références

- Abumrad, N. A., & Davidson, N. O.** (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev*, *92*(3), 1061-1085.
- Afssa, & Afssaps.** (2005). Rapport sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations: Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z.** (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, *15*(7), 539-553.
- Alpers, D. H., Bass, N. M., Engle, M. J., & DeSchryver-Kecsckemeti, K.** (2000). Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta*, *1483*(3), 352-362.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., & Graziano, M. P.** (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, *303*(5661), 1201-1204.
- Alvheim, A. R., Torstensen, B. E., Lin, Y. H., Lillefosse, H. H., Lock, E. J., Madsen, L., Hibbeln, J. R., & Malde, M. K.** (2013). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-arachidonoylglycerol and anandamide in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and mice, and induces weight gain and inflammation in mice. *Br J Nutr*, *109*(8), 1508-1517.
- Armand, M.** (2007). Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *10*(2), 156-164.
- Armand, M., Borel, P., Dubois, C., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Lafont, H., & Lairon, D.** (1994). Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol*, *266*(3 Pt 1), G372-381.
- Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J., & Lairon, D.** (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol*, *271*(1 Pt 1), G172-183.
- Armand, M., Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., & Lairon, D.** (1992). Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *3*(7), 333-341.
- Armand, M., Hamosh, M., Mehta, N. R., Angelus, P. A., Philpott, J. R., Henderson, T. R., Dwyer, N. K., Lairon, D., & Hamosh, P.** (1996). Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant. *Pediatr Res*, *40*(3), 429-437.
- Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., & Lairon, D.** (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr*, *70*(6), 1096-1106.

- Avalli, A., & Contarini, G.** (2005). Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *J Chromatogr A*, *1071*(1-2), 185-190.
- Awada, M., Meynier, A., Soulage, C. O., Hadji, L., Geloen, A., Viau, M., Ribourg, L., Benoit, B., Debard, C., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., & Michalski, M. C.** (2013). n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice. *Nutr Metab (Lond)*, *10*(1), 23.
- Bastard, J. P., & Fèbe, B.** (2013). *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (J. P. Bastard & B. Fèbe Eds. 1 ed.): Springer-Verlag Paris.
- Baumgartner, S., Kelly, E. R., van der Made, S., Berendschot, T. T., Husche, C., Lutjohann, D., & Plat, J.** (2013). The influence of consuming an egg or an egg-yolk buttermilk drink for 12 wk on serum lipids, inflammation, and liver function markers in human volunteers. *Nutrition*, *29*(10), 1237-1244.
- Bazil, V., & Strominger, J. L.** (1991). Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*, *147*(5), 1567-1574.
- Beaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., & Carriere, V.** (2009). Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1. *PLoS One*, *4*(1), e4278.
- Beaslas, O., Torreilles, F., Casellas, P., Simon, D., Fabre, G., Lacasa, M., Delers, F., Chambaz, J., Rousset, M., & Carriere, V.** (2008). Transcriptome response of enterocytes to dietary lipids: impact on cell architecture, signaling, and metabolism genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *295*(5), G942-952.
- Beigneux, A. P., Davies, B. S., Gin, P., Weinstein, M. M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R. L., Wong, J. S., Blaner, W. S., Ding, Z. M., Melford, K., Wongsiriroj, N., Shu, X., de Sauvage, F., Ryan, R. O., Fong, L. G., Bensadoun, A., & Young, S. G.** (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab*, *5*(4), 279-291.
- Benoit, B.** (2013). *Effets des acides gras alimentaires à chaîne longue sur la barrière épithéliale colique*. (PhD), Université Claude Bernard Lyon 1.
- Benoit, B., Bruno, J., Kayal, F., Estienne, M., Debard, C., Ducroc, R., & Plaisancie, P.** (2015). Saturated and Unsaturated Fatty Acids Differently Modulate Colonic Goblet Cells In Vitro and in Rat Pups. *J Nutr*, *145*(8), 1754-1762.
- Benoit, B., Plaisancie, P., Geloen, A., Estienne, M., Debard, C., Meugnier, E., Loizon, E., Daira, P., Bodenec, J., Cousin, O., Vidal, H., Laugerette, F., & Michalski, M. C.** (2014). Pasture v. standard dairy cream in high-fat diet-fed mice: improved metabolic outcomes and stronger intestinal barrier. *Br J Nutr*, *112*(4), 520-535.
- Beylot, M.** (2008). Utilisation des lipides : oxydation ou stockage ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *43*(3), 131-137.
- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Comera, C., Schaak, S., Barbaras, R., Groen, A. K., Perret, B., Terce, F., & Collet, X.** (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem*, *281*(11), 7214-7219.

- Boren, J., Matikainen, N., Adiels, M., & Taskinen, M. R.** (2014). Postprandial hypertriglyceridemia as a coronary risk factor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *431*, 131-142.
- Borgstrom, B.** (1975). On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *J Lipid Res*, *16*(6), 411-417.
- Braun, A., Treede, I., Gotthardt, D., Tietje, A., Zahn, A., Ruhwald, R., Schoenfeld, U., Welsch, T., Kienle, P., Erben, G., Lehmann, W. D., Fuellekrug, J., Stremmel, W., & Ehehalt, R.** (2009). Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflammatory bowel diseases*, *15*(11), 1705-1720.
- Buckley, J. D., & Howe, P. R.** (2009). Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obes Rev*, *10*(6), 648-659.
- Burling, H., Nilsson, A., & Ohlsson, L.** (2009, August 2009). Milk phospholipids, a new ingredient for formulation of functional foods with bioactivity. *Inform*, *20*, 494-496.
- Buts, J. P., Vijverman, V., Barudi, C., De Keyser, N., Maldague, P., & Dive, C.** (1990). Refeeding after starvation in the rat: comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptation. *Eur J Clin Invest*, *20*(4), 441-452.
- Buttet, M., Traynard, V., Tran, T. T., Besnard, P., Poirier, H., & Niot, I.** (2014). From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: role of intestinal lipid-binding proteins. *Biochimie*, *96*, 37-47.
- Byrdwell, W. C., & Perry, R. H.** (2007). Liquid chromatography with dual parallel mass spectrometry and ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of sphingomyelin and dihydrosphingomyelin. II. Bovine milk sphingolipids. *J Chromatogr A*, *1146*(2), 164-185.
- Bysted, A., Holmer, G., Lund, P., Sandstrom, B., & Tholstrup, T.** (2005). Effect of dietary fatty acids on the postprandial fatty acid composition of triacylglycerol-rich lipoproteins in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr*, *59*(1), 24-34.
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D., & Backhed, F.** (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell metabolism*, *22*(4), 658-668.
- Cai, S. F., Kirby, R. J., Howles, P. N., & Hui, D. Y.** (2001). Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res*, *42*(6), 902-909.
- Cajal, Y., Svendsen, A., De Bolos, J., Patkar, S. A., & Alsina, M. A.** (2000). Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase. *Biochimie*, *82*(11), 1053-1061.
- Calder, P. C.** (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, *83*(6 Suppl), 1505s-1519s.
- Cancello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J. L., Bouloumie, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P. A., Barsh, G. S., Zucker, J. D., Basdevant, A., Langin, D., & Clement, K.** (2005). Reduction of macrophage

infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54(8), 2277-2286.

- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C., & Burcelin, R.** (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R.** (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.
- Carriere, F., Barrowman, J. A., Verger, R., & Laugier, R.** (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*, 105(3), 876-888.
- Castro-Gómez, M. P., Rodriguez-Alcalá, L. M., Calvo, M. V., Romero, J., Mendiola, J. A., Ibañez, E., & Fontecha, J.** (2014). Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *J Dairy Sci*, 97(11), 6719-6728.
- Castro-Gomez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F., & Fontecha, J.** (2015). Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 101, 41-51.
- Chang, M., Alsaigh, T., Kistler, E. B., & Schmid-Schonbein, G. W.** (2012). Breakdown of mucin as barrier to digestive enzymes in the ischemic rat small intestine. *PLoS One*, 7(6), e40087.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T.** (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), 92-96.
- Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J., & Demignot, S.** (2005). Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol*, 202(3), 767-776.
- Chaudhri, O., Small, C., & Bloom, S.** (2006). Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1471), 1187-1209.
- Chen, M., Rao, Y., Zheng, Y., Wei, S., Li, Y., Guo, T., & Yin, P.** (2014). Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One*, 9(2), e89288.
- Christie, W. W.** (2013, July 25, 2013). Lipid Structure and Function. Retrieved 2015/11/30, 2015, from <http://lipidlibrary.aocs.org/>
- Ciesielski, F., Griffin, D. C., Rittig, M., Moriyon, I., & Bonev, B. B.** (2013). Interactions of lipopolysaccharide with lipid membranes, raft models - a solid state NMR study. *Biochim Biophys Acta*, 1828(8), 1731-1742.

- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., & Obin, M. S.** (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, *46*(11), 2347-2355.
- Cistola, D. P., Sacchettini, J. C., Banaszak, L. J., Walsh, M. T., & Gordon, J. I.** (1989). Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. A comparative ¹³C NMR study. *J Biol Chem*, *264*(5), 2700-2710.
- Cohen, J. C., Noakes, T. D., & Benade, A. J.** (1988). Serum triglyceride responses to fatty meals: effects of meal fat content. *The American journal of clinical nutrition*, *47*(5), 825-827.
- Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W., & Tandy, S.** (2010). Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients*, *2*(2), 116-127.
- Cohn, J. S., Wat, E., Kamili, A., & Tandy, S.** (2008). Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, *19*(3), 257-262.
- Contarini, G., & Povolo, M.** (2013). Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. *Int J Mol Sci*, *14*(2), 2808-2831.
- Conway, V., Couture, P., Gauthier, S., Pouliot, Y., & Lamarche, B.** (2014). Effect of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women. *Nutrition*, *30*(1), 116-119.
- Conway, V., Couture, P., Richard, C., Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Lamarche, B.** (2013). Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, *23*(12), 1255-1262.
- Conway, V., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y.** (2014). Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, *4*(2), 44-51.
- Costa, M. R., Elias-Argote, X. E., Jiménez-Flores, R., & Gigante, M. L.** (2010). Use of ultrafiltration and supercritical fluid extraction to obtain a whey buttermilk powder enriched in milk fat globule membrane phospholipids. *International Dairy Journal*, *20*(9), 598-602.
- Couedelo, L., Amara, S., Lecomte, M., Meugnier, E., Monteil, J., Fonseca, L., Pineau, G., Cansell, M., Carriere, F., Michalski, M. C., & Vaysse, C.** (2015). Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. *Food Funct*, *6*(5), 1726-1735.
- Cowart, L. A.** (2009). Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(1), 34-42.
- Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumie, A.** (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, *53*(5), 1285-1292.
- Davidson, N. O., Kollmer, M. E., & Glickman, R. M.** (1986). Apolipoprotein B synthesis in rat small intestine: regulation by dietary triglyceride and biliary lipid. *J Lipid Res*, *27*(1), 30-39.
- Davies, L. G. G., & Murdoch, L.** (1959). "Lipostabil": A Pilot Study. *British Medical Journal*, *2*(5152), 619-620.

- de Haas, G. H., Sarda, L., & Roger, J.** (1965). Positional specific hydrolysis of phospholipids by pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta*, *106*(3), 638-640.
- de La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C., & Raybould, H. E.** (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *299*(2), G440-448.
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M.** (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*(Pt 5), 1469-1476.
- Dial, E. J., Romero, J. J., Villa, X., Mercer, D. W., & Lichtenberger, L. M.** (2002). Lipopolysaccharide-induced gastrointestinal injury in rats: role of surface hydrophobicity and bile salts. *Shock*, *17*(1), 77-80.
- Dial, E. J., Zayat, M., Lopez-Storey, M., Tran, D., & Lichtenberger, L.** (2008). Oral phosphatidylcholine preserves the gastrointestinal mucosal barrier during LPS-induced inflammation. *Shock*, *30*(6), 729-733.
- Drover, V. A., Ajmal, M., Nassir, F., Davidson, N. O., Nauli, A. M., Sahoo, D., Tso, P., & Abumrad, N. A.** (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest*, *115*(5), 1290-1297.
- Duan, R. D.** (2005). Anticancer compounds and sphingolipid metabolism in the colon. *In Vivo*, *19*(1), 293-300.
- Duan, R. D., & Nilsson, A.** (2009). Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Prog Lipid Res*, *48*(1), 62-72.
- Dubois, C., Beaumier, G., Juhel, C., Armand, M., Portugal, H., Pauli, A. M., Borel, P., Latge, C., & Lairon, D.** (1998). Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults. *The American journal of clinical nutrition*, *67*(1), 31-38.
- Eckhardt, E. R., Wang, D. Q., Donovan, J. M., & Carey, M. C.** (2002). Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology*, *122*(4), 948-956.
- El-Loly, M.** (2011). Composition, Properties and Nutritional Aspects of Milk Fat Globule Membrane - a Review *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* (Vol. 61, pp. 7).
- Encyclopædia Britannica Online.** Small intestine - high-density lipoprotein: synthesis of lipoprotein complexes. (2007). from <http://global.britannica.com/science/small-intestine/images-videos/Synthesis-of-lipoprotein-complexes-in-the-small-intestine-liver-and/92255>
- Encyclopædia Britannica Online.** Small intestine - Cell types. (2014). from <http://global.britannica.com/science/small-intestine/images-videos/The-small-intestine-contains-many-distinct-types-of-cells-each/107046>
- Erbland, J. F., & Marinetti, G. V.** (1965). The enzymatic acylation and hydrolysis of lysolecithin. *Biochim Biophys Acta*, *106*(1), 128-138.
- Eros, G., Varga, G., Varadi, R., Czobel, M., Kaszaki, J., Ghyczy, M., & Boros, M.** (2009). Anti-inflammatory action of a phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and N-

- acylphosphatidylethanolamine-enriched diet in carrageenan-induced pleurisy. Eur Surg Res, 42(1), 40-48.
- Erridge, C., Kennedy, S., Spickett, C. M., & Webb, D. J.** (2008). Oxidized phospholipid inhibition of toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4: roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition. J Biol Chem, 283(36), 24748-24759.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D.** (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(22), 9066-9071.
- Fauquant, C., Briard-Bion, V., Leconte, N., Guichardant, M., & Michalski, M.-C.** (2007). Membrane phospholipids and sterols in microfiltered milk fat globules. European Journal of Lipid Science and Technology, 109(12), 1167-1173.
- Favé, G., Lévêque, C., Peyrot, J., Pieroni, G., Coste, T. C., & Armand, M.** (2007). *Modulation of gastric lipolysis by the phospholipid specie: link to specific lipase-phospholipid interaction at the lipid/water interface?* Paper presented at the FASEB Journal: Experimental Biology annual meeting, Washington, DC.
- Feng, D., Ohlsson, L., Ling, W., Nilsson, A., & Duan, R. D.** (2010). Generating ceramide from sphingomyelin by alkaline sphingomyelinase in the gut enhances sphingomyelin-induced inhibition of cholesterol uptake in Caco-2 cells. Dig Dis Sci, 55(12), 3377-3383.
- Ferrara, M., Sébédio, J.-L., & Pujos-Guillot, E.** (2012). La métabolomique : de nouvelles perspectives en nutrition humaine. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 47(2), 93-100.
- Fong, B. Y., Norris, C. S., & MacGibbon, A. K. H.** (2007). Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. International Dairy Journal, 17(4), 275-288.
- Fredrikzon, B., Hernell, O., & Blackberg, L.** (1982). Lingual lipase. Its role in lipid digestion in infants with low birthweight and/or pancreatic insufficiency. Acta Paediatr Scand Suppl, 296, 75-80.
- Fritz, H., Seely, D., Flower, G., Skidmore, B., Fernandes, R., Vadeboncoeur, S., Kennedy, D., Cooley, K., Wong, R., Sagar, S., Sabri, E., & Fergusson, D.** (2013). Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: a systematic review. PLoS One, 8(11), e81968.
- Furuya, H., Ohkawara, S., Nagashima, K., Asanuma, N., & Hino, T.** (2008). Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. Int J Vitam Nutr Res, 78(1), 41-49.
- Gallier, S., Gragson, D., Cabral, C., Jiménez-Flores, R., & Everett, D. W.** (2010). Composition and Fatty Acid Distribution of Bovine Milk Phospholipids from Processed Milk Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(19), 10503-10511.
- Garcia-Martinez, C., Marotta, M., Moore-Carrasco, R., Guitart, M., Camps, M., Busquets, S., Montell, E., & Gomez-Foix, A. M.** (2005). Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol, 288(6), C1264-1272.

- Garcia, C., Lutz, N. W., Confort-Gouny, S., Cozzone, P. J., Armand, M., & Bernard, M.** (2012). Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by ³¹P NMR: Towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, *135*(3), 1777-1783.
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Lowe, P. A., Sarda, L., & Verger, R.** (1986). Human gastric lipase. The effect of amphiphiles. *Eur J Biochem*, *156*(2), 305-310.
- Garmy, N., Taieb, N., Yahi, N., & Fantini, J.** (2005). Interaction of cholesterol with sphingosine: physicochemical characterization and impact on intestinal absorption. *J Lipid Res*, *46*(1), 36-45.
- Gautier, T., Masson, D., & Lagrost, L.** (2010). Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'Homme. *EMC, Endocrinologie-Nutrition*, *10-368-A-10*.
- Gérard, P.** (2012). Microbiote intestinal et lipides : impact sur la santé humaine. *OCL*, *19*(4), 223-227.
- Gérard, P., & Bernalier-Donadille, A.** (2007). Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *42, Supplement 2*, 28-36.
- Gimeno, R. E., Hirsch, D. J., Punreddy, S., Sun, Y., Ortegon, A. M., Wu, H., Daniels, T., Stricker-Krongrad, A., Lodish, H. F., & Stahl, A.** (2003). Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem*, *278*(49), 49512-49516.
- Gofman, J. W., Lindgren, F. T., & Elliott, H.** (1949). Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem*, *179*(2), 973-979.
- Golding, M., & Wooster, T. J.** (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *15*(1-2), 90-101.
- Golding, M., Wooster, T. J., Day, L., Xu, M., Lundin, L., Keogh, J., & Clifton, P.** (2011). Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter*, *7*(7), 3513-3523.
- Goncalves, A., Gontero, B., Nowicki, M., Margier, M., Masset, G., Amiot, M. J., & Reboul, E.** (2015). Micellar lipid composition affects micelle interaction with class B scavenger receptor extracellular loops. *J Lipid Res*, *56*(6), 1123-1133.
- Goto, T., Edén, S., Nordenstam, G., Sundh, V., Svanborg-Edén, C., & Mattsby-Baltzer, I.** (1994). Endotoxin levels in sera of elderly individuals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *1*(6), 684-688.
- Goudriaan, J. R., Dahlmans, V. E., Febbraio, M., Teusink, B., Romijn, J. A., Havekes, L. M., & Voshol, P. J.** (2002). Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem*, *239*(1-2), 199-202.
- Greenberg, A. S., & Obin, M. S.** (2006). Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr*, *83*(2), 461s-465s.
- Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M., & Wright, S. D.** (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*, *179*(1), 269-277.
- Hall, A. M., Wiczler, B. M., Herrmann, T., Stremmel, W., & Bernlohr, D. A.** (2005). Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. *J Biol Chem*, *280*(12), 11948-11954.

- Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G., & Raybould, H. E.** (2015). Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *308*(10), G840-851.
- Hamosh, M.** (1990). Lingual and gastric lipases. *Nutrition*, *6*(6), 421-428.
- Hamosh, M., & Burns, W. A.** (1977). Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest*, *37*(6), 603-608.
- Hanamatsu, H., Ohnishi, S., Sakai, S., Yuyama, K., Mitsutake, S., Takeda, H., Hashino, S., & Igarashi, Y.** (2014). Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults. *Nutr Diabetes*, *4*, e141.
- Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L. L., Immerdal, L., & Danielsen, E. M.** (2003). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*, *52*(10), 1424-1431.
- Hartmann, P., Szabo, A., Eros, G., Gurabi, D., Horvath, G., Nemeth, I., Ghyczy, M., & Boros, M.** (2009). Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine in neutrophil leukocyte-dependent acute arthritis in rats. *Eur J Pharmacol*, *622*(1-3), 58-64.
- Haruta-Ono, Y., Setoguchi, S., Ueno, H. M., Higurashi, S., Ueda, N., Kato, K., Saito, T., Matsunaga, K., & Takata, J.** (2012). Orally administered sphingomyelin in bovine milk is incorporated into skin sphingolipids and is involved in the water-holding capacity of hairless mice. *J Dermatol Sci*, *68*(1), 56-62.
- Hauser, H., Dyer, J. H., Nandy, A., Vega, M. A., Werder, M., Bieliauskaite, E., Weber, F. E., Compassi, S., Gemperli, A., Boffelli, D., Wehrli, E., Schulthess, G., & Phillips, M. C.** (1998). Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry*, *37*(51), 17843-17850.
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N., & Stanton, C.** (2014). Role of the gut in modulating lipoprotein metabolism. *Curr Cardiol Rep*, *16*(8), 515.
- Huang, P. L.** (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease models & mechanisms*, *2*(5-6), 231-237.
- Hui, D. Y., & Howles, P. N.** (2002). Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res*, *43*(12), 2017-2030.
- Hussain, M. M., Rava, P., Walsh, M., Rana, M., & Iqbal, J.** (2012). Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)*, *9*, 14.
- Hussain, M. M., Shi, J., & Dreizen, P.** (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res*, *44*(1), 22-32.
- Ide, T.** (2014). Combined effect of sesamin and soybean phospholipid on hepatic fatty acid metabolism in rats. *J Clin Biochem Nutr*, *54*(3), 210-218.
- Iiboshi, Y., Nezu, R., Khan, J., Chen, K., Cui, L., Yoshida, H., Wasa, M., Fukuzawa, M., Kamata, S., Takagi, Y., & Okada, A.** (1996). Developmental changes in distribution of the mucous gel layer and intestinal permeability in rat small intestine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, *20*(6), 406-411.

- Iqbal, J., Walsh, M. T., Hammad, S. M., Cuchel, M., Tarugi, P., Hegele, R. A., Davidson, N. O., Rader, D. J., Klein, R. L., & Hussain, M. M. (2015). Microsomal Triglyceride Transfer Protein Transfers and Determines Plasma Concentrations of Ceramide and Sphingomyelin but Not Glycosylceramide. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(43), 25863-25875.
- Ishikado, A., Nishio, Y., Yamane, K., Mukose, A., Morino, K., Murakami, Y., Sekine, O., Makino, T., Maegawa, H., & Kashiwagi, A. (2009). Soy phosphatidylcholine inhibited TLR4-mediated MCP-1 expression in vascular cells. *Atherosclerosis*, *205*(2), 404-412.
- Ishikawa, J., Takada, S., Hashizume, K., Takagi, Y., Hotta, M., Masukawa, Y., Kitahara, T., Mizutani, Y., & Igarashi, Y. (2009). Dietary glucosylceramide is absorbed into the lymph and increases levels of epidermal sphingolipids. *J Dermatol Sci*, *56*(3), 220-222.
- Jackson, K. G., Wolstencroft, E. J., Bateman, P. A., Yaqoob, P., & Williams, C. M. (2005). Greater enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with apolipoproteins E and C-III after meals rich in saturated fatty acids than after meals rich in unsaturated fatty acids. *The American journal of clinical nutrition*, *81*(1), 25-34.
- Jiang, X.-c., Paultre, F., Pearson, T. A., Reed, R. G., Francis, C. K., Lin, M., Berglund, L., & Tall, A. R. (2000). Plasma Sphingomyelin Level as a Risk Factor for Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *20*(12), 2614-2618.
- Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E., Cushman, S. W., & Periwai, V. (2009). Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol*, *5*(3), 27.
- Johansson, M. E., Sjovall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *10*(6), 352-361.
- Jones, B., Jones, E. L., Bonney, S. A., Patel, H. N., Mensenkamp, A. R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., Meadows, N., Quattrone, A., Islam, S. A., Naoumova, R. P., Angelin, B., Infante, R., Levy, E., Roy, C. C., Freemont, P. S., Scott, J., & Shoulders, C. C. (2003). Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet*, *34*(1), 29-31.
- Jong, M. C., Hofker, M. H., & Havekes, L. M. (1999). Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *19*(3), 472-484.
- Juste, C. (2005). [Dietary fatty acids, intestinal microbiota and cancer]. *Bull Cancer*, *92*(7), 708-721.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R., & Kadowaki, T. (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*, *281*(36), 26602-26614.
- Kamili, A., Wat, E., Tandy, S., Chung, R. W., Brown, A., Rowney, M., Goulburn, M., & Cohn, J. S. (2010). Dietary Milk Phospholipid Improves Diet-Induced Hepatic Steatosis in Mice by Reducing Intestinal Cholesterol Absorption. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, *30*(11), E241-E241.

- Kamp, F., Zakim, D., Zhang, F., Noy, N., & Hamilton, J. A.** (1995). Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry*, *34*(37), 11928-11937.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., & Kasuga, M.** (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*, *116*(6), 1494-1505.
- Karam, S. M.** (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci*, *4*, D286-298.
- Karlsson, A. A., Michelsen, P., & Odham, G.** (1998). Molecular species of sphingomyelin: determination by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with electrospray and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom*, *33*(12), 1192-1198.
- Kayden, H. J., Karmen, A., & Dumont, A.** (1963). Alterations in the Fatty Acid Composition of Human Lymph and Serum Lipoproteins by Single Feedings. *J Clin Invest*, *42*, 1373-1381.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K., & McIntosh, M.** (2009). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr*, *139*(1), 1-4.
- Kennedy, A. J., Ellacott, K. L., King, V. L., & Hasty, A. H.** (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech*, *3*(3-4), 156-166.
- Keogh, J. B., Wooster, T. J., Golding, M., Day, L., Otto, B., & Clifton, P. M.** (2011). Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr*, *141*(5), 809-815.
- Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J., & Lee, J. O.** (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, *130*(5), 906-917.
- Kivinen, A., Salminen, S., Homer, D., & Vapaatalo, H.** (1992). Gastroprotective Effect of Milk Phospholipids, Butter Serum-Lipids and Butter Serum on Ethanol and Acetylsalicylic-Acid Induced Ulcers Rats. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, *47*, 573-575.
- Kivinen, A., Tarpila, S., Kiviluoto, T., Mustonen, H., & Kivilaakso, E.** (1995). Milk and egg phospholipids act as protective surfactants against luminal acid in Necturus gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther*, *9*(6), 685-691.
- Klop, B., Elte, J. W., & Cabezas, M. C.** (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, *5*(4), 1218-1240.
- Kulkarni, B. V., & Mattes, R. D.** (2014). Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *306*(12), R879-885.
- Kullenberg, D., Taylor, L. A., Schneider, M., & Massing, U.** (2012). Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis*, *11*, 3.
- Kyrklund, T.** (1987). Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using prepacked reversed-phase columns. *Lipids*, *22*(4), 274-277.

- Lairon, D.** (2008). Lipémie postprandiale : réponses aux nutriments et conséquences physiopathologiques*. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43(4), 186-190.
- Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P., & Besnard, P.** (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*, 115(11), 3177-3184.
- Laugerette, F., Vors, C., Peretti, N., & Michalski, M. C.** (2011). Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. *Biochimie*, 93(1), 39-45.
- Laville, M., Vors, C., Nazare, J. A., & Michalski, M. C.** (2013). [Importance of the postprandial phase in human health]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, 197(1), 65-77; discussion 77-68.
- Le Kim, D., & Betzing, H.** (1976). Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 357(9), 1321-1331.
- Le, T. T., Miocinovic, J., Nguyen, T. M., Rombaut, R., van Camp, J., & Dewettinck, K.** (2011). Improved Solvent Extraction Procedure and High-Performance Liquid Chromatography–Evaporative Light-Scattering Detector Method for Analysis of Polar Lipids from Dairy Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10407-10413.
- LeBlanc, M. J., Brunet, S., Bouchard, G., Lamireau, T., Yousef, I. M., Gavino, V., Levy, E., & Tuchweber, B.** (2003). Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. *J Nutr Biochem*, 14(1), 40-48.
- Lee, B., Zhu, J., Wolins, N. E., Cheng, J. X., & Buhman, K. K.** (2009). Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochim Biophys Acta*, 1791(12), 1173-1180.
- Levy, E., Menard, D., Suc, I., Delvin, E., Marcil, V., Brissette, L., Thibault, L., & Bendayan, M.** (2004). Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci*, 117(Pt 2), 327-337.
- Libby, P.** (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-874.
- Lindgren, F. T., Jensen, L. C., & Hatch, F. T.** (1972). The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins. In G. J. Nelson (Ed.), *Blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition and metabolism* (pp. 181-274). New York: Wiley.
- Liu, J. J., Nilsson, A., & Duan, R. D.** (2000). Effects of phospholipids on sphingomyelin hydrolysis induced by intestinal alkaline sphingomyelinase: an in vitro study. *J Nutr Biochem*, 11(4), 192-197.
- Liu, X., Xue, Y., Liu, C., Lou, Q., Wang, J., Yanagita, T., Xue, C., & Wang, Y.** (2013). Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids Health Dis*, 12(109), 12-109.
- Lopez-Miranda, J., Williams, C., & Lairon, D.** (2007). Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr*, 98(3), 458-473.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., & Besle, J.-M.** (2008). Phospholipid, Sphingolipid, and Fatty Acid Compositions of the Milk Fat Globule Membrane are Modified by Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5226-5236.

- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R.** (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 175-184.
- MacKenzie, A., Vyssotski, M., & Nekrasov, E.** (2009). Quantitative Analysis of Dairy Phospholipids by ³¹P NMR. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *86*(8), 757-763.
- Mansbach, C. M., & Dowell, R.** (2000). Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J Lipid Res*, *41*(4), 605-612.
- Mardones, P., Quinones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., Miettinen, H. E., Trigatti, B., Krieger, M., VanPatten, S., Cohen, D. E., & Rigotti, A.** (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res*, *42*(2), 170-180.
- Mariadason, J. M., Nicholas, C., L'Italien, K. E., Zhuang, M., Smartt, H. J., Heerdt, B. G., Yang, W., Corner, G. A., Wilson, A. J., Klampfer, L., Arango, D., & Augenlicht, L. H.** (2005). Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterology*, *128*(4), 1081-1088.
- Marshall, J. C.** (2005). Lipopolysaccharide: an endotoxin or an exogenous hormone? *Clin Infect Dis*, *41 Suppl 7*, S470-480.
- Martin, J. C., Berton, A., Ginies, C., Bott, R., Scheercousse, P., Saddi, A., Gripois, D., Landrier, J. F., Dalemans, D., Alessi, M. C., & Delplanque, B.** (2015). Multilevel systems biology modeling characterized the atheroprotective efficiencies of modified dairy fats in a hamster model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *309*(5), H935-945.
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M.** (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, *13*, 453-461.
- Martins, I. J., Mortimer, B. C., Miller, J., & Redgrave, T. G.** (1996). Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *J Lipid Res*, *37*(12), 2696-2705.
- Masuda, D., Hirano, K., Oku, H., Sandoval, J. C., Kawase, R., Yuasa-Kawase, M., Yamashita, Y., Takada, M., Tsubakio-Yamamoto, K., Tochino, Y., Koseki, M., Matsuura, F., Nishida, M., Kawamoto, T., Ishigami, M., Hori, M., Shimomura, I., & Yamashita, S.** (2009). Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J Lipid Res*, *50*(5), 999-1011.
- Mathiassen, J. H., Nejrup, R. G., Frøkiær, H., Nilsson, k., Ohlsson, L., & Hellgren, L. I.** (2015). Emulsifying triglycerides with dairy phospholipids instead of soy lecithin modulates gut lipase activity : Emulsifying triglycerides with dairy phospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*(10), 1522-1539.
- Mattes, R. D.** (2005). Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav*, *86*(5), 691-697.
- Maury, E., & Brichard, S. M.** (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, *314*(1), 1-16.
- Mazzei, J. C., Zhou, H., Brayfield, B. P., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., & Schmelz, E. M.** (2011). Suppression of intestinal inflammation and inflammation-driven colon cancer in mice by dietary sphingomyelin: importance of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *J Nutr Biochem*, *22*(12), 1160-1171.

- McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., Kier, A. B., & Schroeder, F.** (1999). Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res*, *40*(8), 1371-1383.
- Mehran, M., Levy, E., Bendayan, M., & Seidman, E.** (1997). Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *33*(2), 118-128.
- Meikle, P. J., Barlow, C. K., Mellett, N. A., Mundra, P. A., Bonham, M. P., Larsen, A., Cameron-Smith, D., Sinclair, A., Nestel, P. J., & Wong, G.** (2015). Postprandial Plasma Phospholipids in Men Are Influenced by the Source of Dietary Fat. *J Nutr*, *145*(9), 2012-2018.
- Mekki, N., Charbonnier, M., Borel, P., Leonardi, J., Juhel, C., Portugal, H., & Lairon, D.** (2002). Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men. *The Journal of Nutrition*, *132*(12), 3642-3649.
- Michalski, M.-C.** (2009). Specific molecular and colloidal structures of milk fat affecting lipolysis, absorption and postprandial lipemia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(5), 413-431.
- Michalski, M. C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., Fine, F., Joffre, F., Vendevre, J. L., Bouvier, J., Chardigny, J. M., Raynal-Ljutovac, K., & Steering Committee of, R. L.** (2013). Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Prog Lipid Res*, *52*(4), 354-373.
- Michalski, M. C., Leconte, N., Briard-Bion, V., Fauquant, J., Maubois, J. L., & Gouedranche, H.** (2006). Microfiltration of raw whole milk to select fractions with different fat globule size distributions: process optimization and analysis. *J Dairy Sci*, *89*(10), 3778-3790.
- Milger, K., Herrmann, T., Becker, C., Gotthardt, D., Zickwolf, J., Ehehalt, R., Watkins, P. A., Stremmel, W., & Fullekrug, J.** (2006). Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci*, *119*(Pt 22), 4678-4688.
- Moreau, H., Laugier, R., Gargouri, Y., Ferrato, F., & Verger, R.** (1988). Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology*, *95*(5), 1221-1226.
- Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio Mdo, C., & Alfenas Rde, C.** (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*, *108*(5), 801-809.
- Morel, E., Demignot, S., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., & Delers, F.** (2004). Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell*, *15*(1), 132-141.
- Moreno-Navarrete, J., Escoté, X., Ortega, F., Camps, M., Ricart, W., Zorzano, A., Vendrell, J., Vidal-Puig, A., & Fernández-Real, J.** (2015). Lipopolysaccharide binding protein is an adipokine involved in the resilience of the mouse adipocyte to inflammation. *Diabetologia*, *58*(10), 2424-2434.
- Moreno-Navarrete, J. M., Escote, X., Ortega, F., Serino, M., Campbell, M., Michalski, M. C., Laville, M., Xifra, G., Luche, E., Domingo, P., Sabater, M., Pardo, G., Waget, A., Salvador, J., Giralt,**

- M., Rodriguez-Hermosa, J. I., Camps, M., Kolditz, C. I., Viguerie, N., Galitzky, J., Decaunes, P., Ricart, W., Fruhbeck, G., Villarroya, F., Mingrone, G., Langin, D., Zorzano, A., Vidal, H., Vendrell, J., Burcelin, R., Vidal-Puig, A., & Fernandez-Real, J. M.** (2013). A role for adipocyte-derived lipopolysaccharide-binding protein in inflammation- and obesity-associated adipose tissue dysfunction. *Diabetologia*, *56*(11), 2524-2537.
- Morifuji, M., Higashi, S., Oba, C., Ichikawa, S., Kawahata, K., Yamaji, T., Itoh, H., Manabe, Y., & Sugawara, T.** (2015). Milk Phospholipids Enhance Lymphatic Absorption of Dietary Sphingomyelin in Lymph-Cannulated Rats. *Lipids*, *50*(10), 987-996.
- Morrison, L. M.** (1958). Serum cholesterol reduction with lecithin. *Geriatrics*, *13*(1), 12-19.
- Motouri, M., Matsuyama, H., Yamamura, J., Tanaka, M., Aoe, S., Iwanaga, T., & Kawakami, H.** (2003). Milk sphingomyelin accelerates enzymatic and morphological maturation of the intestine in artificially reared rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *36*(2), 241-247.
- Mu, H., & Hoy, C. E.** (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, *43*(2), 105-133.
- Mun, S., Decker, E. A., & McClements, D. J.** (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, *40*(6), 770-781.
- Murphy, M. C., Isherwood, S. G., Sethi, S., Gould, B. J., Wright, J. W., Knapper, J. A., & Williams, C. M.** (1995). Postprandial lipid and hormone responses to meals of varying fat contents: modulatory role of lipoprotein lipase? *European Journal of Clinical Nutrition*, *49*(8), 578-588.
- Nabli, F., & Ricroch, L. (2012). Enquête Emploi du temps 2009-2010 *Insee Résultats - Société* (Vol. 130). France: INSEE.
- Nauli, A. M., Sun, Y., Whittimore, J. D., Atyia, S., Krishnaswamy, G., & Nauli, S. M.** (2014). Chylomicrons produced by Caco-2 cells contained ApoB-48 with diameter of 80-200 nm. *Physiol Rep*, *2*(6).
- Neeli, I., Siddiqi, S. A., Siddiqi, S., Mahan, J., Lagakos, W. S., Binas, B., Gheyi, T., Storch, J., & Mansbach, C. M., 2nd.** (2007). Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *282*(25), 17974-17984.
- Nilsson, A.** (1968). Metabolism of sphingomyelin in the intestinal tract of the rat. *Biochim Biophys Acta*, *164*(3), 575-584.
- Nilsson, A., & Duan, R. D.** (2006). Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J Lipid Res*, *47*(1), 154-171.
- Niot, I., Poirier, H., Tran, T. T., & Besnard, P.** (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res*, *48*(2), 101-115.
- Nishimukai, M., & Hara, H.** (2007). Soybean phosphatidylcholine-induced enhancement of lymphatic absorption of triglyceride depends on chylomicron formation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, *71*(5), 1192-1197.
- Noh, S. K., & Koo, S. I.** (2004). Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J Nutr*, *134*(10), 2611-2616.

- Nordestgaard, B. G., Benn, M., Schnohr, P., & Tybjaerg-Hansen, A.** (2007). Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. Jama-Journal of the American Medical Association, 298(3), 299-308.
- Nusrat, A., Turner, J. R., & Madara, J. L.** (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 279(5), G851-857.
- Nyberg, L., Duan, R. D., & Nilsson, A.** (2000). A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol. J Nutr Biochem, 11(5), 244-249.
- Ohlsson, L., Burling, H., Duan, R. D., & Nilsson, A.** (2010). Effects of a sphingolipid-enriched dairy formulation on postprandial lipid concentrations. Eur J Clin Nutr, 64(11), 1344-1349.
- Ohlsson, L., Burling, H., & Nilsson, A.** (2009). Long term effects on human plasma lipoproteins of a formulation enriched in butter milk polar lipid. Lipids Health Dis, 8, 44.
- Ohlsson, L., Hertervig, E., Jonsson, B. A., Duan, R. D., Nyberg, L., Svernlöv, R., & Nilsson, A.** (2010). Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin. Am J Clin Nutr, 91(3), 672-678.
- Oosthuizen, W., Vorster, H. H., Vermaak, W. J., Smuts, C. M., Jerling, J. C., Veldman, F. J., & Burger, H. M.** (1998). Lecithin has no effect on serum lipoprotein, plasma fibrinogen and macro molecular protein complex levels in hyperlipidaemic men in a double-blind controlled study. Eur J Clin Nutr, 52(6), 419-424.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K.** (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol, 11(2), 85-97.
- Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P. L., Juhel, C., Storch, J., Hamosh, M., & Armand, M.** (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. J Biol Chem, 277(31), 28070-28079.
- Park, E. J., Suh, M., & Clandinin, M. T.** (2005). Dietary ganglioside and long-chain polyunsaturated fatty acids increase ganglioside GD3 content and alter the phospholipid profile in neonatal rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, 46(7), 2571-2575.
- Park, E. J., Suh, M., Thomson, B., Ma, D. W., Ramanujam, K., Thomson, A. B., & Clandinin, M. T.** (2007). Dietary ganglioside inhibits acute inflammatory signals in intestinal mucosa and blood induced by systemic inflammation of Escherichia coli lipopolysaccharide. Shock, 28(1), 112-117.
- Park, E. J., Suh, M., Thomson, B., Thomson, A. B., Ramanujam, K. S., & Clandinin, M. T.** (2005). Dietary ganglioside decreases cholesterol content, caveolin expression and inflammatory mediators in rat intestinal microdomains. Glycobiology, 15(10), 935-942.
- Pelaseyed, T., Bergstrom, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schutte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodriguez-Pineiro, A. M., Nystrom, E. E., Wising, C., Johansson, M. E., & Hansson, G. C.** (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. Immunol Rev, 260(1), 8-20.

- Petit, V., Arnould, L., Martin, P., Monnot, M. C., Pineau, T., Besnard, P., & Niot, I.** (2007). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res*, *48*(2), 278-287.
- Petit, V., Niot, I., Poirier, H., & Besnard, P.** (2007). Absorption intestinale des acides gras : faits et incertitudes. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *21*(1), 38-45.
- Phillips, M. L., Pullinger, C., Kroes, I., Kroes, J., Hardman, D. A., Chen, G., Curtiss, L. K., Gutierrez, M. M., Kane, J. P., & Schumaker, V. N.** (1997). A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant. *J Lipid Res*, *38*(6), 1170-1177.
- Pike, L. J.** (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, *44*(4), 655-667.
- Pilch, P. F., Meshulam, T., Ding, S., & Liu, L.** (2011). Caveolae and lipid trafficking in adipocytes. *Clinical lipidology*, *6*(1), 49-58.
- Poitou, C., & Clément, K.** (2007). Le tissu adipeux : un acteur majeur du syndrome inflammatoire de l'obésité ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *42*(2), 90-96.
- Polichetti, E., Diaconescu, N., De La Porte, P. L., Malli, L., Portugal, H., Pauli, A. M., Lafont, H., Tuchweber, B., Yousef, I., & Chanussot, F.** (1996). Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. *Br J Nutr*, *75*(3), 471-478.
- Pollin, T. I., Damcott, C. M., Shen, H., Ott, S. H., Shelton, J., Horenstein, R. B., Post, W., McLenithan, J. C., Bielak, L. F., Peyser, P. A., Mitchell, B. D., Miller, M., O'Connell, J. R., & Shuldiner, A. R.** (2008). A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science*, *322*(5908), 1702-1705.
- Potten, C. S., & Loeffler, M.** (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, *110*(4), 1001-1020.
- Quarfordt, S. H., & Goodman, D. S.** (1966). Heterogeneity in the rate of plasma clearance of chylomicrons of different size. *Biochim Biophys Acta*, *116*(2), 382-385.
- Ramprasath, V. R., Jones, P. J., Buckley, D. D., Woollett, L. A., & Heubi, J. E.** (2013). Effect of dietary sphingomyelin on absorption and fractional synthetic rate of cholesterol and serum lipid profile in humans. *Lipids Health Dis*, *12*, 125.
- Raynal-Ljutovac, K., Bouvier, J., Gayet, C., Simon, N., Joffre, F., Fine, F., Vendevre, J.-L., Lopez, C., Chardigny, J.-M., Michalski, M.-C., Genot, C., & Listral, m. d. R.** (2011). Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *OCL*, *18*(6), 324-351.
- Reis, M. G., Roy, N. C., Bermingham, E. N., Ryan, L., Bibiloni, R., Young, W., Krause, L., Berger, B., North, M., Stelwagen, K., & Reis, M. M.** (2013). Impact of dietary dairy polar lipids on lipid metabolism of mice fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem*, *61*(11), 2729-2738.
- Rigotti, A., Acton, S. L., & Krieger, M.** (1995). The Class B Scavenger Receptors SR-BI and CD36 Are Receptors for Anionic Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(27), 16221-16224.
- Robertson, M. D., Parkes, M., Warren, B. F., Ferguson, D. J., Jackson, K. G., Jewell, D. P., & Frayn, K. N.** (2003). Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut*, *52*(6), 834-839.

- Roche, H. M., Zampelas, A., Jackson, K. G., Williams, C. M., & Gibney, M. J.** (1998). The effect of test meal monounsaturated fatty acid: saturated fatty acid ratio on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr*, *79*(5), 419-424.
- Rodríguez-Alcalá, L. M., & Fontecha, J.** (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A*, *1217*(18), 3063-3066.
- Rodriguez, C., Gonzalez-Diez, M., Badimon, L., & Martinez-Gonzalez, J.** (2009). Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thromb Haemost*, *101*(4), 665-673.
- Rombaut, R., Camp, J. V., & Dewettinck, K.** (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science & Technology*, *41*(4), 435-443.
- Rombaut, R., Dewettinck, K., & Van Camp, J.** (2007). Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC–ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(3–4), 308-312.
- Rosqvist, F., Smedman, A., Lindmark-Mansson, H., Paulsson, M., Petrus, P., Straniero, S., Rudling, M., Dahlman, I., & Riserus, U.** (2015). Potential role of milk fat globule membrane in modulating plasma lipoproteins, gene expression, and cholesterol metabolism in humans: a randomized study. *Am J Clin Nutr*, *102*(1), 20-30.
- Sadouki, M., & Bouchoucha, M.** (2014). Changes of lipid and fatty acid absorption induced by high dose of citric acid ester and lecithin emulsifiers. *Int J Food Sci Nutr*, *65*(6), 728-732.
- Salvini, S., Charbonnier, M., Defoort, C., Alquier, C., & Lairon, D.** (2002). Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *Br J Nutr*, *87*(3), 211-217.
- Sanchez-Juanes, F., Alonso, J. M., Zancada, L., & Hueso, P.** (2009). Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Biol Chem*, *390*(1), 31-40.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H.** (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415-418.
- Sato, Y.** (1970). The metabolic fate of lysolecithin administered into rat duodenal lumen. *Tohoku J Exp Med*, *100*(3), 277-287.
- Schlierf, C., Falor, W. H., Wood, P. D., Lee, Y. L., & Kinsell, L. W.** (1969). Composition of human chyle chylomicrons following single fat feedings. *Am J Clin Nutr*, *22*(1), 79-86.
- Schlitt, A., Blankenberg, S., Yan, D., von Gizycki, H., Buerke, M., Werdan, K., Bickel, C., Lackner, K. J., Meyer, J., Rupprecht, H. J., & Jiang, X.-C.** (2006). Further evaluation of plasma sphingomyelin levels as a risk factor for coronary artery disease. *Nutr Metab (Lond)*, *3*(1), 1-8.
- Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Webb, S. K., Reiter, A., Adams, J., & Merrill, A. H., Jr.** (1996). Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the

- proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. Cancer Res, 56(21), 4936-4941.
- Schnabl, K. L., Larcelet, M., Thomson, A. B., & Clandinin, M. T.** (2009). Uptake and fate of ganglioside GD3 in human intestinal Caco-2 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 297(1), G52-59.
- Schneeberger, M., Everard, A., Gomez-Valades, A. G., Matamoros, S., Ramirez, S., Delzenne, N. M., Gomis, R., Claret, M., & Cani, P. D.** (2015). Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. Sci Rep, 5, 16643.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R.** (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. bioRxiv.
- Seyer, A., Cantiello, M., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Nauze, M., Bezirard, V., Collet, X., Touboul, D., Brunelle, A., & Comera, C.** (2013). Lipidomic and spatio-temporal imaging of fat by mass spectrometry in mice duodenum during lipid digestion. PLoS One, 8(4), e58224.
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H., & Flier, J. S.** (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest, 116(11), 3015-3025.
- Shiau, Y. F., Fernandez, P., Jackson, M. J., & McMonagle, S.** (1985). Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 248(6), G608-G617.
- Shim, J., Moulson, C. L., Newberry, E. P., Lin, M. H., Xie, Y., Kennedy, S. M., Miner, J. H., & Davidson, N. O.** (2009). Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. J Lipid Res, 50(3), 491-500.
- Shoelson, S. E., Herrero, L., & Naaz, A.** (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. Gastroenterology, 132(6), 2169-2180.
- Siddiqi, S., & Mansbach, C. M., 2nd.** (2012). Phosphorylation of Sar1b protein releases liver fatty acid-binding protein from multiprotein complex in intestinal cytosol enabling it to bind to endoplasmic reticulum (ER) and bud the pre-chylomicron transport vesicle. J Biol Chem, 287(13), 10178-10188.
- Siddiqi, S., Saleem, U., Abumrad, N. A., Davidson, N. O., Storch, J., Siddiqi, S. A., & Mansbach, C. M., 2nd.** (2010). A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. J Lipid Res, 51(7), 1918-1928.
- Siddiqi, S., Sheth, A., Patel, F., Barnes, M., & Mansbach, C. M., 2nd.** (2013). Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. Biochim Biophys Acta, 1831(8), 1311-1321.
- Siddiqi, S. A., & Mansbach, C. M., 2nd.** (2008). PKC zeta-mediated phosphorylation controls budding of the pre-chylomicron transport vesicle. J Cell Sci, 121(Pt 14), 2327-2338.
- Singh, H., Ye, A., & Horne, D.** (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. Prog Lipid Res, 48(2), 92-100.
- Slotte, J. P.** (2013). Biological functions of sphingomyelins. Prog Lipid Res, 52(4), 424-437.

- Snow, D. R., Jimenez-Flores, R., Ward, R. E., Cambell, J., Young, M. J., Nemere, I., & Hintze, K. J.** (2010). Dietary milk fat globule membrane reduces the incidence of aberrant crypt foci in Fischer-344 rats. *J Agric Food Chem*, *58*(4), 2157-2163.
- Snow, D. R., Ward, R. E., Olsen, A., Jimenez-Flores, R., & Hintze, K. J.** (2011). Membrane-rich milk fat diet provides protection against gastrointestinal leakiness in mice treated with lipopolysaccharide. *J Dairy Sci*, *94*(5), 2201-2212.
- Spiegel, S., & Merrill, A. H., Jr.** (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Faseb j*, *10*(12), 1388-1397.
- Spitsberg, V. L.** (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J Dairy Sci*, *88*(7), 2289-2294.
- Stahl, A., Hirsch, D. J., Gimeno, R. E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L. A., & Lodish, H. F.** (1999). Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell*, *4*(3), 299-308.
- Steiner, A., Domanski, B., & Seegal, D.** (1944). Effect of Feeding of "Soya Lecithin" on Serum Cholesterol Level of Man. *Experimental Biology and Medicine*, *55*(4), 236-238.
- Stremmel, W.** (1988). Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest*, *82*(6), 2001-2010.
- Stremmel, W., Ehehalt, R., Staffer, S., Stoffels, S., Mohr, A., Karner, M., & Braun, A.** (2012). Mucosal protection by phosphatidylcholine. *Dig Dis*, *30 Suppl 3*, 85-91.
- Stremmel, W., & Gauss, A.** (2013). Lecithin as a therapeutic agent in ulcerative colitis. *Digestive diseases*, *31*(3-4), 388-390.
- Stremmel, W., Hanemann, A., Ehehalt, R., Karner, M., & Braun, A.** (2010). Phosphatidylcholine (lecithin) and the mucus layer: Evidence of therapeutic efficacy in ulcerative colitis? *Dig Dis*, *28*(3), 490-496.
- Stremmel, W., Lotz, G., Strohmeyer, G., & Berk, P. D.** (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest*, *75*(3), 1068-1076.
- Tafesse, F. G., Ternes, P., & Holthuis, J. C. M.** (2006). The Multigenic Sphingomyelin Synthase Family. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29421-29425.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T.** (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*, *277*(46), 44507-44512.
- Teng, K. T., Chang, C. Y., Chang, L. F., & Nesaretnam, K.** (2014). Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutr J*, *13*, 12.
- Thompson, L. U., Jenkins, D. J., Amer, M. A., Reichert, R., Jenkins, A., & Kamulsky, J.** (1982). The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Am J Clin Nutr*, *36*(6), 1106-1111.

- Tobias, D. K., Chen, M., Manson, J. E., Ludwig, D. S., Willett, W., & Hu, F. B.** (2015). Effect of low-fat diet interventions versus other diet interventions on long-term weight change in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(12), 968-979.
- Tobias, P. S., Mathison, J., Mintz, D., Lee, J. D., Kravchenko, V., Kato, K., Pugin, J., & Ulevitch, R. J.** (1992). Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7(3), 239-245.
- Tompkins, R. K., & Parkin, L. G.** (1980). Effects of long-term ingestion of soya phospholipids on serum lipids in humans. *Am J Surg*, 140(3), 360-364.
- Tran, T. T. T., Poirier, H., Clément, L., Nassir, F., Pelsers, M. M. A. L., Petit, V., Degrace, P., Monnot, M.-C., Glatz, J. F. C., Abumrad, N. A., Besnard, P., & Niot, I.** (2011). Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 25201-25210.
- Tranchant, T., Besson, P., Hoinard, C., Pinault, M., Alessandri, J. M., Delarue, J., Couet, C., & Gore, J.** (1998). Long-term supplementation of culture medium with essential fatty acids alters alpha-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(6), 621-629.
- Treede, I., Braun, A., Sparla, R., Kuhnel, M., Giese, T., Turner, J. R., Anes, E., Kulaksiz, H., Fullekrug, J., Stremmel, W., Griffiths, G., & Ehehalt, R.** (2007). Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *J Biol Chem*, 282(37), 27155-27164.
- Tressou-Cosmao, J., Pasteau, S., Le Guillou, C., & Simon, N.** (2015). Analyse des apports nutritionnels en acides gras de la population française à partir des données INCA 2. France: Terres Univia.
- Trigatti, B. L., Anderson, R. G., & Gerber, G. E.** (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(1), 34-39.
- Trotter, P. J., Ho, S. Y., & Storch, J.** (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res*, 37(2), 336-346.
- Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I.** (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3(4), 213-223.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I.** (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031.
- Vague, J.** (1947). La différenciation sexuelle; facteur déterminant des formes de l'obésité. *La Presse Médicale*, 55(30), 339-340.
- Voet, D., & Voet, J. G.** (2005). *Biochimie* (G. Rousseau & L. Domenjoud, Trans. D. B. Supérieur Ed.).
- Vors, C.** (2012). *Impact de la structure de la matière grasse sur l'absorption et le devenir métabolique des lipides et des endotoxines chez l'Homme normo-pondéré ou obèse.* (PhD), INSA de Lyon. (NNT : 2012ISAL0091)
- Vors, C., Capolino, P., Guerin, C., Meugnier, E., Pesenti, S., Chauvin, M. A., Monteil, J., Peretti, N., Cansell, M., Carriere, F., & Michalski, M. C.** (2012). Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food Funct*, 3(5), 537-546.

- Vors, C., Drai, J., Gabert, L., Pineau, G., Laville, M., Vidal, H., Guichard, E., Michalski, M. C., & Feron, G.** (2015). Salivary composition in obese vs normal-weight subjects: towards a role in postprandial lipid metabolism? *Int J Obes (Lond)*, *39*(9), 1425-1428.
- Vors, C., Nazare, J. A., Michalski, M. C., & Laville, M.** (2014). Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité*, *9*(1), 31-41.
- Vors, C., Pineau, G., Gabert, L., Drai, J., Louche-Pelissier, C., Defoort, C., Lairon, D., Desage, M., Danthine, S., Lambert-Porcheron, S., Vidal, H., Laville, M., & Michalski, M. C.** (2013). Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial. *The American journal of clinical nutrition*, *97*(1), 23-36.
- Wang, H., Du, J., Lu, S., Yao, Y., Hunter, F., & Black, D. D.** (2001). Regulation of intestinal apolipoprotein A-I synthesis by dietary phosphatidylcholine in newborn swine. *Lipids*, *36*(7), 683-687.
- Wang, T. Y., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q. H.** (2013). New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest*, *43*(11), 1203-1223.
- Wasan, K. M., Brocks, D. R., Lee, S. D., Sachs-Barrable, K., & Thornton, S. J.** (2008). Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, *7*(1), 84-99.
- Wat, E., Tandy, S., Kapera, E., Kamili, A., Chung, R. W. S., Brown, A., Rowney, M., & Cohn, J. S.** (2009). Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis*, *205*(1), 144-150.
- Watanabe, S., Takahashi, T., Tanaka, L., Haruta, Y., Shiota, M., Hosokawa, M., & Miyashita, K.** (2011). The effect of milk polar lipids separated from butter serum on the lipid levels in the liver and the plasma of obese-model mouse (KK-Ay). *Journal of Functional Foods*, *3*(4), 313-320.
- Weihrauch, J., & Son, Y.-S.** (1983). Phospholipid content of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *60*(12), 1971-1978.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr.** (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, *112*(12), 1796-1808.
- Wilde, P. J., & Chu, B. S.** (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Adv Colloid Interface Sci*, *165*(1), 14-22.
- Williams, C. M.** (1998). Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. *Atherosclerosis*, *141 Suppl 1*, S87-92.
- Wood, P., Imaichi, K., Knowles, J., Michaels, G., & Kinsell, L.** (1964). The lipid composition of human plasma chylomicrons. *J Lipid Res*, *5*, 225-231.
- Wurfel, M. M., & Wright, S. D.** (1997). Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J Immunol*, *158*(8), 3925-3934.

- Xiang, S. Q., Cianflone, K., Kalant, D., & Sniderman, A. D.** (1999). Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res*, *40*(9), 1655-1663.
- Xie, Y., Newberry, E. P., Young, S. G., Robine, S., Hamilton, R. L., Wong, J. S., Luo, J., Kennedy, S., & Davidson, N. O.** (2006). Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency. *J Biol Chem*, *281*(7), 4075-4086.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H.** (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, *112*(12), 1821-1830.
- Yen, C. L., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C., & Farese, R. V., Jr.** (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*, *49*(11), 2283-2301.
- Zakim, D.** (2000). Thermodynamics of fatty acid transfer. *J Membr Biol*, *176*(2), 101-109.
- Zayat, M., Lichtenberger, L. M., & Dial, E. J.** (2008). Pathophysiology of LPS-induced gastrointestinal injury in the rat: role of secretory phospholipase A2. *Shock*, *30*(2), 206-211.
- Zheng, X. F., Hong, Y. X., Feng, G. J., Zhang, G. F., Rogers, H., Lewis, M. A., Williams, D. W., Xia, Z. F., Song, B., & Wei, X. Q.** (2013). Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by *Candida albicans* mediated up-regulation of EB13 expression. *PLoS One*, *8*(5), e63967.
- Zhou, A. L., Hintze, K. J., Jimenez-Flores, R., & Ward, R. E.** (2012). Dietary fat composition influences tissue lipid profile and gene expression in Fischer-344 rats. *Lipids*, *47*(12), 1119-1130.
- Zhou, S. L., Stump, D., Kiang, C. L., Isola, L. M., & Berk, P. D.** (1995). Mitochondrial aspartate aminotransferase expressed on the surface of 3T3-L1 adipocytes mediates saturable fatty acid uptake. *Proc Soc Exp Biol Med*, *208*(3), 263-270.
- Zhu, J., Lee, B., Buhman, K. K., & Cheng, J.-X.** (2009). A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by ex vivo and in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging. *J Lipid Res*, *50*(6), 1080-1089.
- Zilversmit, D. B.** (1965). The composition and structure of lymph chylomicrons in dog, rat, and man. *J Clin Invest*, *44*(10), 1610-1622.
- Zilversmit, D. B.** (1995). Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clinical Chemistry*, *41*(1), 153-158.

Annexe 1

Gène	Fonction	Etude de régime				Etude de gavage	
		Duod	Jéj	TA	Foie	Duod	Jéj
Gène de ménage							
TBP	Facteur de transcription	X	X	X	X	X	X
RPLP0	Protéine ribosomale acide 60S P0		X		X		
Métabolisme des lipides							
FABP2	Transporteur d'AG	X	X			X	X
FATP4	Transporteur d'AG	X	X			X	
CD36	Transporteur d'AG, senseur de micelles	X	X	X		X	X
MTTP	Accrétion des TG	X	X			X	X
SAR1b	Transfert des pre-CM du Golgi au RE	X	X			X	X
APOB	Apolipoprotéine B	X	X			X	X
ADFP	Formation de gouttelettes lipidiques	X	X			X	X
PPARα	Facteur de transcription	X	X				
SRBI	Transport cholestérol, senseur de micelles	X	X				X
ENPP7	Hydrolyse de la SM en Cer	X	X			X	X
SGMS2	Synthèse de SM à partir de Cer	X	X	X		X	X
CEBPα	Lipogénèse			X			
PPARγ	Facteur de transcription, lipogénèse			X			
Adipoq	Adiponectine			X			
Lep	Leptine			X			
LXRα	Facteur de transcription				X	X	
SREBP-1c	Facteur de transcription, lipogénèse				X		
SCD-1	Synthèse de MUFA à partir de SFA				X		
DGAT2	Formation de TG à partir de DG et Acyl-coa				X		

Gène	Fonction	Etude de régime				Etude de gavage	
		Duod	Jéj	TA	Foie	Duod	Jéj
Inflammation							
TLR4	Récepteur de la LBP	X	X	X	X		
CD14	Récepteur de la LBP	X	X	X			
LBP	Protéine de transport des LPS	X	X	X	X		
IL-6	Chemokine pro-inflammatoire			X			
IL-1β	Chemokine pro-inflammatoire			X	X		
IL-10	Chemokine anti-inflammatoire			X			
TNFα	Chemokine pro-inflammatoire			X			
MCP1	Facteur chemoattractant, pro-inflammatoire			X			
CD11c	Marqueur de l'infiltration macrophagique, spécifique des M1 pro-inflammatoire			X	X		
CD68	Marqueur de l'infiltration macrophagique			X	X		
F4/80	Marqueur de l'infiltration macrophagique				X		

Duod : duodénum ; Jéj : jéjunum ; TA : tissu adipeux

Annexe 2

Critères d'inclusion et de non-inclusion du protocole VALOBAB Digestion

- **Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- 18 ans ≤ Age < 75 ans
- Homme et femme
- Iléostomie temporaire ou définitive secondaire à :
 - Rectocolite hémorragique
 - Maladie de Crohn colique pure
 - Lésion péri-anale
 - Polypose adénomateuse familiale
- Iléostomie considérée comme fonctionnelle
- Iléostomie stable depuis plus de 2 mois et un débit de stomie inférieur à 1L/jour sans Imodium®

OU

- Anastomose iléo-anale
- Absence d'intolérance aux produits laitiers
- Cholestérol total <7 mmol/l, triglycérides <3 mmol/l
- Absence de pathologie décelable à l'examen clinique et à l'interrogatoire
- Affilié à un régime de sécurité sociale.

- **Critères de non inclusion**

Les critères de non inclusion sont les suivants :

Critères généraux

- Sujet présentant des conditions médicales ou psychologiques instables qui d'après l'investigateur, pourraient mener le sujet à être non compliant ou non coopératif pendant l'étude ou pouvant compromettre la sécurité ou la participation du sujet à l'étude (selon les articles L.1121-6, L.1121-8, L.1121-9 et L1122-1-2 du code de santé publique).
- Non-respect de la période d'exclusion d'une autre étude précisée dans le « fichier National des volontaires ».
- Sujets majeurs sous tutelle.
- Sujets privés de leur liberté par décision judiciaire ou administrative.

- Sujet ayant dépassé le montant annuel d'indemnités dans l'année pour la participation à des protocoles de recherche.

Critères biologiques

- ASAT, ALAT > 2 fois les valeurs normales
- Mise en évidence d'une anomalie biologique jugée par l'investigateur comme cliniquement significative

Critères médicaux et thérapeutiques :

- Iléostomie secondaire à un cancer digestif non encore guéri
- Iléostomie secondaire à une maladie de Crohn autre que colique pure
- Sujets traités par un médicament pouvant interférer avec le métabolisme des lipides (hypolipémiants, corticoïdes pendant plus de 8 jours, anorexigènes, médicaments à visée d'amaigrissement).
- Toute pathologie évolutive associée (pathologie cardiaque, diabète, hypertension artérielle, psychiatrique, rénale ou hépatique).
- La consommation de plus de 40 g d'alcool par jour.
- Présence de dyslipidémie familiale.
- Sujet claustrophobe
- Sujets qui expriment toute réticence à consommer un repas à base de lait et de matière grasse laitière, sujets intolérants aux produits laitiers.
- Affection sévère évolutive.
- Etat dépressif ou psychiatrique (traitement par antidépresseur ou à visée psychotrope).
- Antécédents médicaux ou chirurgicaux jugés par l'investigateur comme étant non compatibles avec cette étude.
- Don de sang dans les 2 mois précédant l'inclusion.