



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



## REMERCIEMENTS

Je remercie très respectueusement le Professeur Pierre DROUIN, Professeur de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, pour son soutien en qualité de directeur de recherche dans la réalisation de cette thèse. Sa disponibilité permanente a été précieuse pour la réflexion sur les projets de recherche et pour la discussion de nos résultats. C'est pour moi l'occasion de lui témoigner ma profonde gratitude pour la rigueur médicale et scientifique qu'il m'a enseignée. Je suis particulièrement honoré qu'il accepte de juger cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Louis MONNIER, Professeur de l'Université de Montpellier, qui me fait l'honneur d'être rapporteur et de juger cette thèse. Je tiens à lui faire part de ma profonde admiration et de mon respect. J'ai toujours beaucoup appris à son contact et bénéficié de la justesse de son raisonnement et de la clairvoyance de ses synthèses médicales et scientifiques.

Je remercie très vivement le Professeur Henri GIN, Professeur de l'Université de Bordeaux, pour le privilège qu'il me fait d'être rapporteur et juge de ce travail. Lors de nos nombreuses rencontres, j'ai bénéficié de son jugement éclairé et apprécié ses analyses dans les domaines clinique et scientifique.

Je tiens également à remercier très chaleureusement le Professeur Jean-François STOLTZ, Professeur de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, pour m'avoir fait l'honneur de participer au jugement de ce travail et pour m'avoir guidé dans l'accomplissement de cette thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Louis PAUL, Professeur de l'Université Paris XI, qui me fait l'honneur et la joie de juger ce travail. J'ai toujours apprécié la clarté de son analyse et sa justesse scientifique dans les travaux que nous avons conduits ensemble. Son dynamisme permanent et son analyse critique et constructive ont constitué une aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier toutes les personnes, professeurs ou médecins des hôpitaux, directeurs de recherche, infirmières hospitalières et infirmières de recherche, ainsi que les étudiants qui ont permis de mettre en place les projets de recherche et de m'aider à concrétiser la plupart d'entre eux. Je remercie très vivement l'ensemble de mes collègues de travail, médecins, infirmières et secrétaires, avec lesquels je travaille chaque jour, pour m'avoir aidé dans ma pratique clinique quotidienne, ou pour avoir participé de près ou de loin aux réflexions et discussions de mes travaux. Je tiens en particulier à remercier :

le Professeur Olivier ZIEGLER, Professeur de l'Université Henri Poincaré Nancy I  
le Professeur Vincent DURLACH, Professeur de l'Université de Reims  
le Professeur Bruno VERGES, Professeur de l'Université de Dijon  
le Professeur Faiez ZANNAD, Professeur de l'Université Henri Poincaré Nancy I  
le Docteur Anik GIRARD-GLOBA, directeur de recherche  
le Docteur Mireille DONNER, directeur de recherche

le Docteur Samy HADJADJ  
le Docteur Didier QUILLIOT  
le Docteur Pascal MATTEI  
le Docteur Philip BÖHME  
le Docteur Eric BENAMO  
le Docteur Anna KEARNEY-SCHWARTZ  
Monsieur Mohamed YOUNSI  
Madame Corinne BORG

Enfin, mes pensées vont naturellement à ma famille, tout particulièrement à Geneviève et à mon fils Antoine qui, auprès de moi, m'ont soutenu dans mes nombreuses soirées solitaires et ont accepté mes mouvements d'humeur essentiellement liés aux caprices de l'informatique.

### **SOUTIEN FINANCIER**

L'ensemble de ces travaux n'aurait probablement pas pu être conduit de façon satisfaisante, si nous n'avions obtenu plusieurs bourses de recherche, et en particulier :

- une bourse provenant des Programmes Hospitaliers de Recherche Clinique en 1994
- une bourse de recherche ARCOL - Fournier en 1998
- une bourse de Contrat de Programme de Recherche Clinique en 1999, délivrée par le CHU de Nancy
- Enfin, plusieurs assurances de responsabilité civile ont été obtenues auprès du CHU de Nancy, par l'intermédiaire de la Direction de Recherche Clinique.

## LISTE DES PUBLICATIONS

### 1 - Travaux scientifiques relatifs au sujet de la thèse d'Université

- **Articles scientifiques**

HADJADJ S, PAUL JL, MEYER L, DURLACH V, VERGES B, ZIEGLER O, DROUIN P, **GUERCI B**. Delayed Changes in Postprandial Lipid in Young Normolipidemic Men after a Nocturnal Vitamin A Oral Fat Load Test. J Nutr, 1999, 129, 1649-55 (publication relative au DEA de Microbiologie, Enzymologie et Nutrition du Dr Samy HADJADJ : travail encadré par le Dr Bruno GUERCI)

**GUERCI B**, VERGES B, DURLACH V, HADJADJ S, DROUIN P, PAUL JL. Relationship between altered postprandial lipidemia and insulin resistance in normolipidemic and normogluucose tolerant obese patients. Int J Obesity, 2000, 24, 468-478

**GUERCI B**, HADJADJ S, QUILLIOT D, ZIEGLER O, DROUIN P. No acute response of leptin to an oral fat load in obese patients and during circadian rhythm in healthy controls. Eur J Endocrinol, 2000, 143, 649-655

**GUERCI B**, PAUL JL, HADJADJ S, DURLACH V, VERGES B, ATTIA N, GIRARD-GLOBA A, DROUIN P. Analysis of the Postprandial Lipid Metabolism: Use of a 3-Point Test. Diab Metab, 2001, in press

- **Abstracts et congrès à comité de lecture**

**GUERCI B**, VERGES B, PAUL JL, DOUSSET B, DURLACH V. Relationship between insulin resistance, leptin and postprandial lipemia responses in normal and overweight patients. 57th Annual Meeting American Diabetes Association, 21-24 Juin, Boston. Diabetes, 1997, 46 (Suppl 1), 60A (communication orale)

**GUERCI B**, PAUL JL, VERGES B, DURLACH V. Etude de la lipémie post-prandiale chez des sujets normolipémiques présentant une surcharge pondérale modérée. Journées francophones de nutrition, 26-28 Novembre 1997, Paris. Nutr Clin Metabol, 1997, 11 (Suppl), 318

**GUERCI B**, PAUL JL, VERGES B, DURLACH V, DROUIN P. Anomalies de l'épuration postprandiale des lipoprotéines riches en triglycérides chez des patients insulinorésistants normolipidiques avec surcharge pondérale. ALFEDIAM, 24-27 Mars 1998. Diabète Métab, 1998, 24 (Suppl 1), LI

HADJADJ S, PAUL JL, DURLACH V, VERGES B, DROUIN P, **GUERCI B**. Métabolisme postprandial des lipoprotéines et de la vitamine A. Modifications circadiennes. ALFEDIAM, 24-27 Mars 1998. Diabète Métab, 1998, 24 (Suppl 1), LII

**GUERCI B**, PAUL JL, VERGES B, DROUIN P, DURLACH V. Standardisation et validation en 3 points de l'analyse de l'épuration lipidique postprandiale : étude sur une population de témoins, obèses et diabétiques de type 2. ALFEDIAM, 21-24 Mars 2000, Grenoble. Diabetes Metab, 2000, 26 (Suppl 1), XLIV

DURLACH V, DURLACH A, PAUL JL, VERGES B, **GUERCI B**, DUSSERRE N, GIRARD-GLOBA A. Evaluation par un test de surcharge lipidique orale de l'impact de facteurs génétiques et environnementaux sur l'épuration post-prandiale et le transport inverse du cholestérol. ALFEDIAM, 30 Mars-4 Avril 1999, Paris. Diabète Métab, 1999, 25 (Suppl 1), XXX

**GUERCI B**, PAUL JL, VERGES B, DROUIN P, DURLACH V. Standardisation et validation en 3 points de l'analyse de l'épuration lipidique postprandiale : étude sur une population de témoins, obèses et diabétiques de type 2. ALFEDIAM, 21-24 Mars 2000, Grenoble. Diab Metab, 2000, 26 (Suppl 1), XLIV

**GUERCI B**, MATTEI P, YOUNSI M, PAUL JL, ZIEGLER O, DONNER M, DROUIN P. Anomalies postprandiales de composition phospho-lipidique des HDL chez l'obèse insulino-résistant. ALFEDIAM, 21-24 Mars 2000, Grenoble. Diab Metab, 2000, 26 (suppl 1), XLIII

**GUERCI B**, YOUNSI M, PAUL JL, ZIEGLER O, DONNER M, DROUIN P. Relation entre le degré d'insulino-résistance et l'enrichissement postprandial en phospholipides des HDL de patientes obèses androïdes. Société Française d'Endocrinologie, 4-7 Octobre 2000, Brest. Ann Endocrinol, 2000, 61, 392

BOHME P, KEARNEY-SCHWARTZ A, PAUL JL, ZANNAD F, ZIEGLER O, DROUIN P, **GUERCI B**. Dysfonction endothéliale du sujet coronarien : influence des lipides postprandiaux. ALFEDIAM, 27-31 Mars 2001, Montpellier. Diab Metab, 2001, 27 (suppl 1), S65

- **Revue nationale à comité de lecture**

**GUERCI B**. Physiopathologie des altérations du métabolisme postprandial des lipides : de nouveaux acteurs en cause. Le courrier de l'ARCOL, 2000, 2, 63-69

**GUERCI B**, LAIRON D. Méthodes d'exploration du métabolisme lipidique postprandial : évaluation et propositions de standardisation. Le courrier de l'ARCOL, 2000, 2, 70-72

## **2 - Travaux scientifiques sur les maladies métaboliques, le métabolisme lipidique et l'action de l'insuline**

**GUERCI B**, IGAU B, CREA T, ZIEGLER O, TOTO A, FRUCHART JC, DROUIN P, FIEVET C. Lack of relationship between Lp(a) particle levels and albumin excretion rate in type I diabetic patients. Diabète Métab, 1994, 20, 526-531.

**GUERCI B**, IGAU B, ZIEGLER O, CREA T, FRUCHART JC, DROUIN P, FIEVET C. Intraperitoneal insulin infusion improves the depletion in choline-containing phospholipids of lipoprotein B particles in type I diabetic patients. Metabolism, 1996, 45, 430-434

**GUERCI B**, MEYER L, SOMMER S, GEORGE JL, ZIEGLER O, DROUIN P, ANGIOI-DUPREZ K. Severity of diabetic retinopathy is linked to lipoprotein(a) in type 1

diabetic patients. *Diabetes Metabolism*, 1999, 25, 412-418

**GUERCI B**, ANTEBI H, MEYER L, DURLACH V, ZIEGLER O, NICOLAS JP, ALCINDOR LG, DROUIN P. Increased ability of LDL from normolipidemic type 2 diabetic women to generate peroxides. *Clin Chem*, 1999, 45, 1439-1448

**GUERCI B**, MEYER L, SALLE A, CHARRIE A, DOUSSET B, ZIEGLER O, DROUIN P. Comparison of metabolic deterioration between insulin analog and regular insulin after a 5-hour interruption of a continuous subcutaneous insulin infusion in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84, 2673-8

### 3 - Autres travaux scientifiques

GUERCI AP, **GUERCI B**, LEVY-MARCHAL C, ONGAGNA J, ZIEGLER O, CANDILOROS H, GUERCI O, DROUIN P. Onset of insulin-dependent diabetes mellitus after interferon alfa therapy for hairy cell leukemia. *Lancet*, 1994, 343, 1167-1168.

ZIEGLER O, **GUERCI B**, MULLER S, CANDILOROS H, MEJEAN L, DONNER M, STOLTZ JF, DROUIN P. Increased erythrocyte aggregation in insulin dependent diabetes mellitus and its relationship to plasma factors. A multivariate analysis. *Metabolism*, 1994, 43, 1182-1186.

ZIEGLER O, **GUERCI B**, ALGAN M, LONCHAMP P, WEBER M, DROUIN P. Improved visual evoked potential latencies in poorly controlled diabetic patients after short-term strict metabolic control. *Diabetes Care*, 1994, 17, 1141-1147.

**GUERCI B**, MEYER L, DELBACHIAN I, KOLOPP M, ZIEGLER O, DROUIN P. Blood glucose control on Sunday in IDDM patients: intensified conventional insulin therapy versus continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Res Clin Pract*, 1998, 40, 175-180

VIGOUROUX C, BOURUT C, **GUERCI B**, ZIEGLER O, MAGRE J, CAPEAU J, MEYER L. A new missense mutation in the calcium-sensing receptor in familial benign hypercalcemia associated with partial lipomatosis and insulin resistant diabetes. *Clin Endocrinol*, 2000, 53, 393-398

VIGOUROUX C, MAGRE J, VANTYGHM MC, BOURUT C, LASCOLS O, SHACKLETON S, LLYOD DJ, **GUERCI B**, PADOVA G, VALENSI P, GRIMALDI A, PIQUEMAL R, TOURAINE P, TREMBATH RC, CAPEAU J. Lamin A/C Gene - Sex-determined expression of mutations in dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipomatosis. *Diabetes*, 2000, 49, 1958-1962

## SOMMAIRE

<b>Première Partie : Etat de la question</b>	page 14
<b>I - Introduction</b>	page 15
<b>II - Les différentes classes de lipoprotéines circulantes</b>	page 17
1 - Composition générale des lipoprotéines circulantes	page 17
2 - Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques	page 18
<b>III - Physiologie des lipides et lipoprotéines plasmatiques en période postprandiale</b>	page 24
1 - Physiologie de l'absorption digestive	page 24
2 - Métabolisme des lipoprotéines en période postprandiale	page 25
<b>IV - Caractéristiques principales de la lipémie postprandiale</b>	page 29
1 - Situations cliniques influençant la réponse lipidique postprandiale	page 29
2 - Facteurs prédictifs de la réponse lipidique postprandiale	page 32
3 - Effets des nutriments sur la lipémie postprandiale	page 33
<b>V - Altérations du métabolisme lipidique postprandial et risque vasculaire</b>	page 37
1 - Triglycéridémie à jeun et athérosclérose	page 37
2 - Lipides postprandiaux et athérosclérose	page 37
<b>VI - Altérations du métabolisme lipidique postprandial et maladies métaboliques</b>	page 41
1 - Lipides postprandiaux, obésité et insulino-résistance	page 41
2 - Lipides postprandiaux et diabète	page 43
3 - Lipémie postprandiale au cours des dyslipidémies	page 45
<b>VII - Facteurs d'athérogénicité du métabolisme lipidique postprandial</b>	page 46
1 - Remnants de chylomicrons, VLDL ou remnants de VLDL	page 46
2 - Anomalies qualitatives des lipoprotéines	page 49
3 - Lipides postprandiaux et coagulation	page 52
4 - Altérations de la fonction endothéliale	page 53
<b>VIII - Méthodes d'exploration du métabolisme lipidique postprandial</b>	page 58
1 - Conditions générales de réalisation	page 58
2 - Nature et composition du repas d'épreuve lipidique	page 58
3 - Niveau calorique et quantité en lipides du repas test en fonction des paramètres anthropométriques	page 60
4 - Méthodologie de l'épreuve d'hyperlipémie provoquée : durée de l'épreuve, fréquence des mesures biologiques et paramètres étudiés	page 60
5 - Marqueurs biologiques de l'épuration lipidique	page 61



<b>IX - Traitements pharmacologiques des altérations de l'épuration lipidique postprandiale</b>	page 64	
<b>Deuxième Partie : Travaux de recherche</b>	page 68	
<b>I - Objectifs</b>	page 69	
<b>II - Patients et sujets témoins</b>	page 70	
<b>III - Epreuve dynamique d'hyperlipémie provoquée (test de charge orale en lipides)</b>	page 71	1
- Mise au point du repas lipidique test	page 71	
2 - Ajustement des quantités de nutriments sur les paramètres cliniques	page 77	
3 - Utilisation de la vitamine A	page 78	
<b>IV - Techniques biologiques</b>	page 78	
1 - Séparation des lipoprotéines	page 78	
2 - Paramètres lipidiques	page 80	
3 - Palmitate de rétinol	page 81	
4 - Autres mesures biochimiques	page 82	
5 - Mesure de la sensibilité à l'insuline (rappel)	page 83	
<b>V - Méthodes statistiques</b>	page 85	
<b>VI - Premier Article</b>	page 87	
1 - Argumentaire	page 89	
2 - Présentation de l'étude	page 91	
3 - Résultats de l'étude	page 91	
4 - Discussion des résultats	page 92	
5 - Conclusions	page 93	
<b>VII - Deuxième Article</b>	page 94	
1 - Argumentaire	page 96	
2 - Présentation de l'étude	page 98	
3 - Résultats de l'étude	page 99	
4 - Discussion des résultats	page 100	
5 - Conclusions	page 100	
<b>VIII - Troisième Article</b>	page 102	
1 - Argumentaire : rappel sur la leptine	page 104	
2 - Présentation de l'étude	page 107	
3 - Résultats de l'étude	page 108	
4 - Discussion des résultats	page 109	
5 - Conclusions	page 113	
<b>IX - Quatrième Article</b>	page 114	
1 - Argumentaire	page 116	

2 - Présentation de l'étude	page 117
3 - Résultats de l'étude	page 118
4 - Discussion des résultats	page 119
5 - Conclusions	page 120
<b>Troisième Partie : Travaux en cours, perspectives et conclusions</b>	page 122
<b>I - Synthèse des travaux réalisés</b>	page 123
<b>II - Avenir de l'exploration lipidique postprandiale</b>	page 124
<b>III - Travaux en cours : études d'observation et d'intervention dans le domaine cardiovasculaire</b>	page 125
A - Etude d'observation	page 125
1 - Argumentaire	page 125
2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires	page 127
B - Etude d'intervention	page 129
1 - Argumentaire	page 129
2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires	page 129
<b>IV - Travaux en cours dans le domaine physiopathologique</b>	page 130
A - Lipémie postprandiale et efflux de cholestérol	page 130
1 - Argumentaire	page 130
2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires	page 132
B - Lipémie postprandiale, composition des HDL et insulino-résistance	page 136
1 - Argumentaire	page 136
2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires	page 138
<b>V - Perspectives : études <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i></b>	page 140
1 - Réactivité de la cellule endothéliale en présence de lipoprotéines riches en triglycérides	page 140
2 - Echanges lipidiques entre les lipoprotéines plasmatiques et les cellules adipo-cytaire et érythrocytaire	page 141
<b>VI - Conclusions générales</b>	page 143
<b>Quatrième Partie : Bibliographie</b>	page 145
<b>Cinquième Partie : Annexes</b>	page 176
<b>Annexe 1 : enveloppe Soleau</b>	page 177
<b>Annexe 2 : articles publiés</b>	page 182

- Article 1** page 183  
Delayed changes in postprandial lipid in young normolipidemic men after a nocturnal vitamin A oral fat load test.  
J Nutr, 1999, 129, 1649-55
- Article 2** page 190  
Relationship between altered postprandial lipidemia and insulin resistance in normolipidemic and normogluucose tolerant obese patients. Int J Obesity, 2000, 24, 468-478
- Article 3** page 201  
No acute response of leptin to an oral fat load in obese patients and during circadian rhythm in healthy controls.  
Eur J Endocrinol, 2000, 143, 649-655
- Article 4** page 208  
Analysis of the postprandial lipid metabolism: Use of a 3-point test.  
Diab Metab, 2001, in press

## ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

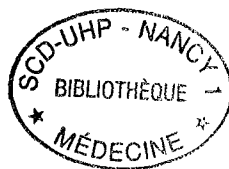
<b>Figure 1</b> Métabolisme des chylomicrons	page 19
<b>Figure 2</b> Métabolisme des VLDL	page 20
<b>Figure 3</b> Métabolisme des LDL	page 21
<b>Figure 4</b> Métabolisme des HDL, enzymes et échanges lipidiques	page 23
<b>Figure 5</b> Résistance tissulaire à l'action de l'insuline et métabolisme lipidique postprandial	page 43
<b>Figure 6</b> Transcytose des lipoprotéines dans la paroi vasculaire	page 47
<b>Figure 7</b> Mécanismes de l'athérogénicité des lipides postprandiaux	page 49
<b>Figure 8</b> Mécanismes physiopathologiques de formation des LDL petites et denses	page 51
<b>Figure 9</b> Physiologie de la vasorégulation de la cellule endothéliale	page 54
<b>Figure 10</b> Mécanismes d'action des lipides sur l'endothélium vasculaire	page 56
<b>Figure 11</b> Analyse en chromatographie en phase gazeuse de la composition en acides gras du repas lipidique test	page 76
<b>Figure 12</b> Lipase endothéliale et lipoprotéines riches en triglycérides	page 127
<b>Figure 13</b> Vasodilatation artérielle endothélium-dépendante (après ischémie)	page 128
<b>Figure 14</b> Efflux de cholestérol à jeun et postprandial chez le sujet obèse	page 134
<b>Figure 15</b> Composition en phospholipides des HDL et insulino-résistance : rôle de l'activité de la PLTP	page 139

<b>Figure 16</b> Membrane des érythrocytes, HDL-PL et insulino-résistance	page 142
-----	
<b>Tableau 1</b> Principales études sur le rôle athérogène des altérations du métabolisme lipidique postprandial	page 40
<b>Tableau 2</b> Principales études d'intervention thérapeutique sur les altérations du métabolisme lipidique postprandial	page 66
<b>Tableau 3</b> Evolution dans l'élaboration et la composition du repas lipidique test	page 73
<b>Tableau 4</b> Composition du repas lipidique test actuel	page 75
<b>Tableau 5</b> Analyse multivariée de la capacité d'efflux de cholestérol des femmes obèses androïdes comparées à des femmes et des hommes de poids normal	page 135

## GLOSSAIRE

TG	triglycéride
CM	chylomicron
nCM	non chylomicron
VLDL	very-low density lipoprotein
IDL	intermediate density lipoprotein
LDL	low density lipoprotein
HDL	high density lipoprotein
LRT	lipoprotéines riches en triglycérides
Apo	apoprotéine
RP	palmitate de rétinol
RE	ester de rétinol
AGL	acides gras libres
PL	phospholipide
CL	cholestérol libre
LSR	lipolysis stimulated receptor
LRP	LDL receptor related protein
LPL	lipoprotéine lipase
TGLH	triglycéride lipase hépatique
CETP	cholesterol ester transfer protein
PLTP	phospholipid transfer protein
LE	lipase endothéliale
ACAT	acyl CoA cholesterol acyl transferase
LCAT	lecithin cholesterol acyl transferase
PAI1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
IMC	indice de masse corporelle
HOMA	Homeostasis Model Assessment
ITG	intolérants au glucose
ASC	aire sous la courbe
AUC	area under the curve
NO	monoxyde d'azote (oxyde nitrique)
eNOS	NO synthase endothéliale
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
PGH <sub>2</sub>	prostaglandine
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A2
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monomethyl-L-arginine
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
VCAM	vascular cell adhesion molecule
CLHP	chromatographie liquide haute performance

## **Première Partie : Etat de la question**



## I - Introduction

L'évolution des connaissances biochimiques et moléculaires des lipides et lipoprotéines plasmatiques a conduit à proposer de nouvelles approches sur les mécanismes physiopathologiques qui relient anomalies lipidiques et développement de l'athérosclérose. Une de ces approches est fondée sur la théorie d'athérogénicité des lipoprotéines riches en triglycérides, et en particulier sur les altérations touchant les remnants (ou résidus) des chylomicrons.

Il est usuel et pratique de déterminer les paramètres du métabolisme lipidique sur des échantillons sanguins obtenus après une nuit de jeûne, afin de dépister une anomalie lipidique. Cette approche d'un grand intérêt clinique ne permet pas à elle seule une évaluation exhaustive du métabolisme lipidique. En ce qui concerne les triglycérides dont l'apport principal est l'alimentation, leur évaluation dans ces conditions strictes de jeûne, ne présente qu'un intérêt limité si l'on considère qu'un homme normal, prenant au minimum 3 repas quotidiens, est plus souvent en période postprandiale que réellement à jeun. Nos apports alimentaires fréquents, en particulier en lipides, entraînent ainsi des modifications répétées des équilibres métaboliques dont l'état à jeun n'est qu'un reflet partiel et limité.

L'étude du métabolisme postprandial des lipides s'est fortement développée dans les deux dernières décennies. Elle présente plusieurs intérêts : décrire les réponses métaboliques des individus en rapport avec l'assimilation des lipides alimentaires dans un contexte donné, mesurer les variations quantitatives et qualitatives des paramètres lipoprotéiniques, et établir des relations entre le métabolisme postprandial et les paramètres métaboliques à jeun. Elle permet en outre de révéler par une approche dynamique, des anomalies du métabolisme lipidique



indétectables à jeun, de caractériser des phénotypes clinico-biologiques et des pathologies associés à des altérations du métabolisme postprandial, d'identifier la formation de particules lipoprotéiques potentiellement athérogènes dont l'accumulation peut n'être que transitoire, et surtout d'associer des défauts du métabolisme lipidique en période postprandiale au risque cardiovasculaire.

Cette approche a été proposée par Zilversmit dès 1979 dans un article intitulé "Atherogenesis: a postprandial phenomenon" [252]. De nombreux travaux de recherche plus récents n'ont fait qu'apporter de nouveaux éléments confortant cette conception. Dans des situations pathologiques telles que l'obésité à distribution viscérale, le diabète de type 2, mais également chez des patients atteints d'hypertension artérielle ou de maladie cardiovasculaire authentifiée, des altérations du métabolisme lipidique postprandial ont été clairement rapportées, alors même que le profil lipidique à jeun de ces populations n'était que partiellement modifié. Ainsi, la prise en compte de l'amplitude, de la répétition et de la durée des épisodes postprandiaux conduit à considérer que les paramètres mesurés à jeun sont surtout un reflet des variations postprandiales.

L'hypothèse d'un mécanisme reliant le métabolisme postprandial des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) et le développement de l'athérosclérose se heurte cependant à des difficultés d'ordre biologique, statistique et méthodologique. L'analyse du métabolisme des lipides et lipoprotéines plasmatiques en période postprandiale est très complexe, les modifications touchant simultanément les concentrations et la composition des lipoprotéines plasmatiques. Il est en règle générale difficile d'identifier spécifiquement laquelle des lipoprotéines est en cause dans les altérations du métabolisme postprandial observées au cours de telle ou telle situation clinique. L'absence de consensus sur les paramètres et sur la périodicité avec

laquelle ils doivent être mesurés au cours de la période postprandiale, ne facilite pas la diffusion et le développement de ces épreuves dynamiques. En outre, aucune standardisation du test d'hyperlipidémie provoquée (composition du repas expérimental, durée de l'épreuve, ...) n'est à ce jour établie.

Ainsi, l'intérêt clinique, de dépistage voire de pronostic du risque cardiovasculaire, de ces épreuves d'hyperlipidémie provoquée reste controversé par certains qui leur reprochent leur absence de physiologie nutritionnelle humaine, et leur manque de pouvoir discriminant spécifique eu égard aux paramètres lipidiques classiquement mesurés le matin à jeun. La signification physiopathologique des variations lipidiques, mais aussi métaboliques et endocriniennes qui accompagnent la prise de ces épreuves d'hyperlipidémie provoquée, demande à être mieux définie. Enfin, toutes les études conduites jusqu'à présent chez l'homme sont de type rétrospectif ou cas-témoins, mais aucune étude prospective n'a été menée à ce jour pour démontrer que les altérations du métabolisme lipidique postprandial constituent un facteur causal d'athérosclérose ou de développement de maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète.

## **II - Les différentes classes de lipoprotéines circulantes**

### **1 - Composition générale des lipoprotéines circulantes**

Les lipoprotéines circulantes sont des macromolécules hydrosolubles constituées d'une partie protéique dite apoprotéine et d'une partie lipidique composée de cholestérol libre, de cholestérol estérifié, de triglycérides et de phospholipides. La quantité de ces différents constituants est variable selon la lipoprotéine considérée, lui conférant des propriétés physico-chimiques propres. Les apoprotéines ont trois types de fonctions :

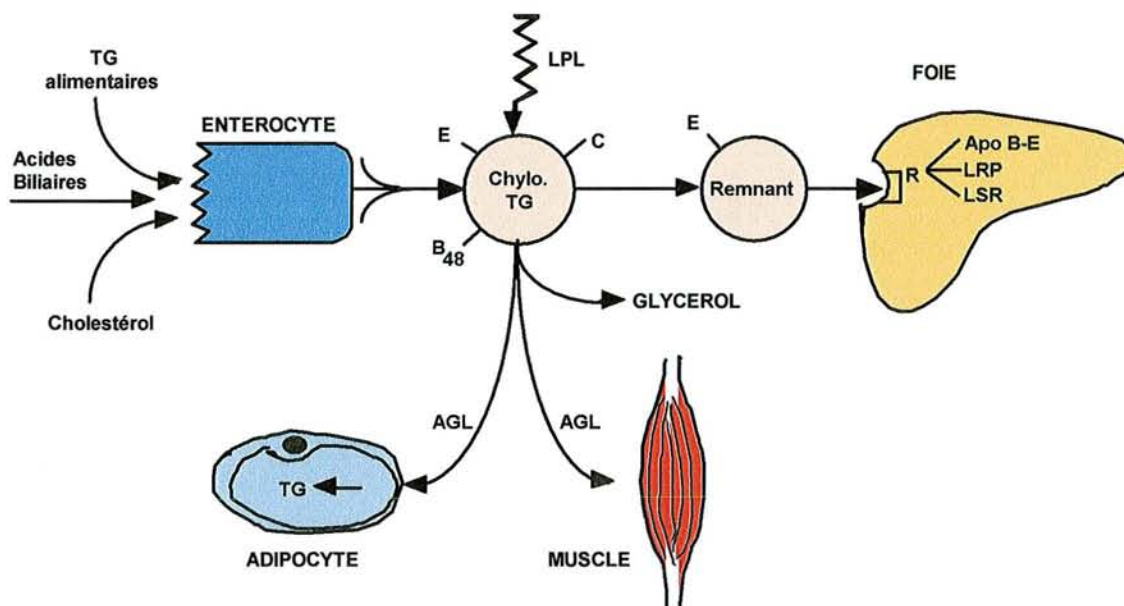
protéines de structure des lipoprotéines, cofacteurs enzymatiques, ligands pour des récepteurs spécifiques.

## 2 - Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques

### • Les chylomicrons

Les chylomicrons sont les lipoprotéines plasmatiques les plus volumineuses et les moins denses. Ces lipoprotéines sont synthétisées dans l'entérocyte et transportent les triglycérides exogènes apportés par l'alimentation. Elles possèdent une apoprotéine spécifique, l'apo B48 et acquièrent dans la circulation les apo C-II et C-III et l'apo E cédées par les lipoprotéines de haute densité (HDL). Le catabolisme des chylomicrons met en jeu la *lipoprotéine lipase* (LPL) synthétisée par les tissus adipeux et musculaires. Exprimée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux qui irriguent ces tissus, elle hydrolyse les triglycérides des CM libérant ainsi les acides gras qui constituent une source d'énergie pour les tissus périphériques : soit en étant directement oxydés (cellules musculaires), soit en étant stockés (adipocytes). L'apo C-II est le cofacteur indispensable à l'activité de la lipoprotéine lipase, l'apo C-III ayant une action inhibitrice. Ainsi, le rapport C-II/C-III à la surface des CM est déterminant dans l'efficacité de la lipolyse. Au cours de cette hydrolyse, des éléments de surface des CM (phospholipides, cholestérol libre, apoprotéine) se détachent et rejoignent le pool des HDL. Après hydrolyse, les particules résiduelles encore appelées remnants de chylomicrons sont captées par le foie grâce à des récepteurs, notamment le LRP (LDL Related LDL receptor) dont le ligand est l'apo E (**Figure 1**).

**Figure 1 :  
Métabolisme des chylomicrons**



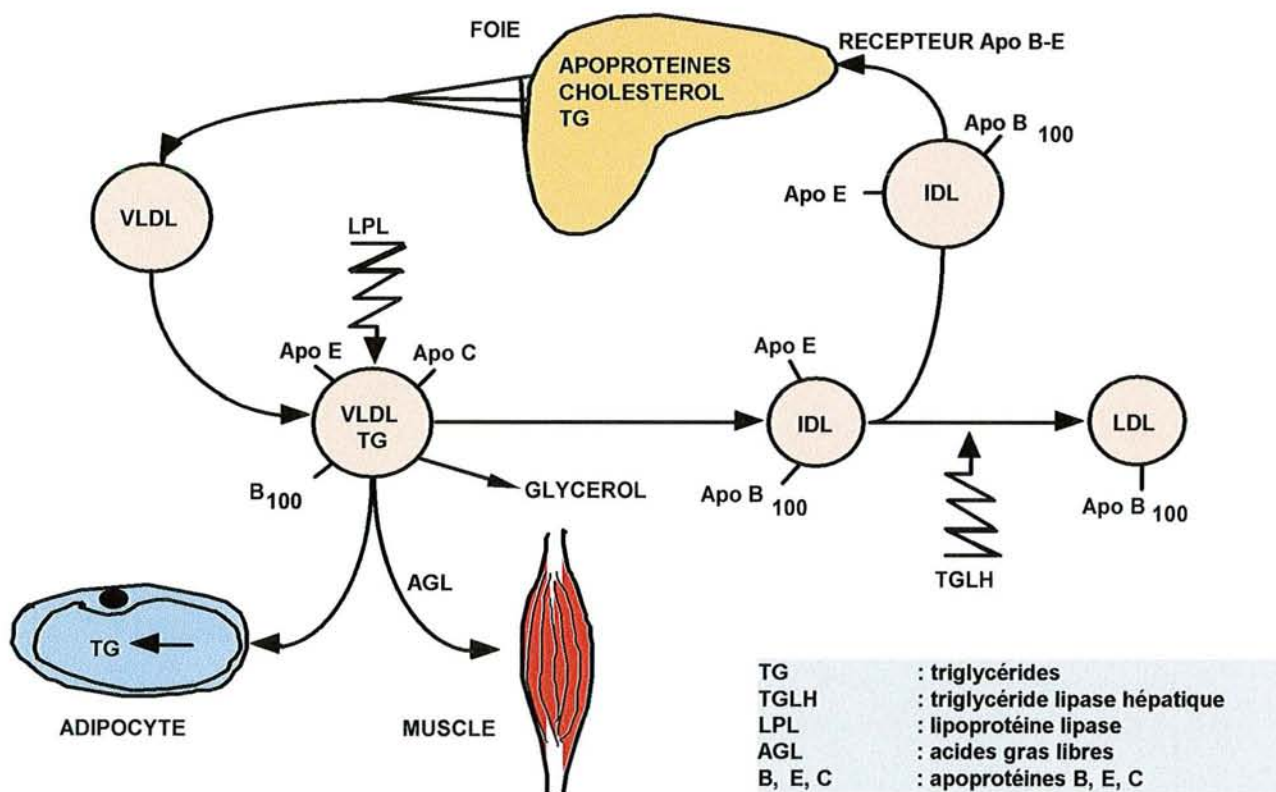
TG	: triglycérides
LPL	: lipoprotéine lipase
AGL	: acides gras libres
E, C, B <sub>48</sub>	: apoprotéines E, C, B 48

- **Les lipoprotéines légères contenant l'apo B100 : VLDL, IDL, LDL**

Plus de 90 p.100 des triglycérides plasmatiques sont synthétisés dans le foie et sont sécrétés dans le plasma sous forme de VLDL. Ces lipoprotéines comportent une apoprotéine majoritaire, l'apo B100 et des apos E et C. Comme pour les CM, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase en présence d'apo C-II permettant la libération d'acides gras captés par les tissus périphériques. Les particules résiduelles encore appelées remnants de VLDL ou IDL (intermediate density lipoprotein) sont captées en partie par le foie grâce aux récepteurs E et B/E et sont catabolisées. L'autre partie des IDL s'appauvrit en triglycérides et s'enrichit en esters de cholestérol grâce à l'action de la *triglycéride lipase hépatique* (TGLH) et de la *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP) qui assure le transfert des esters de

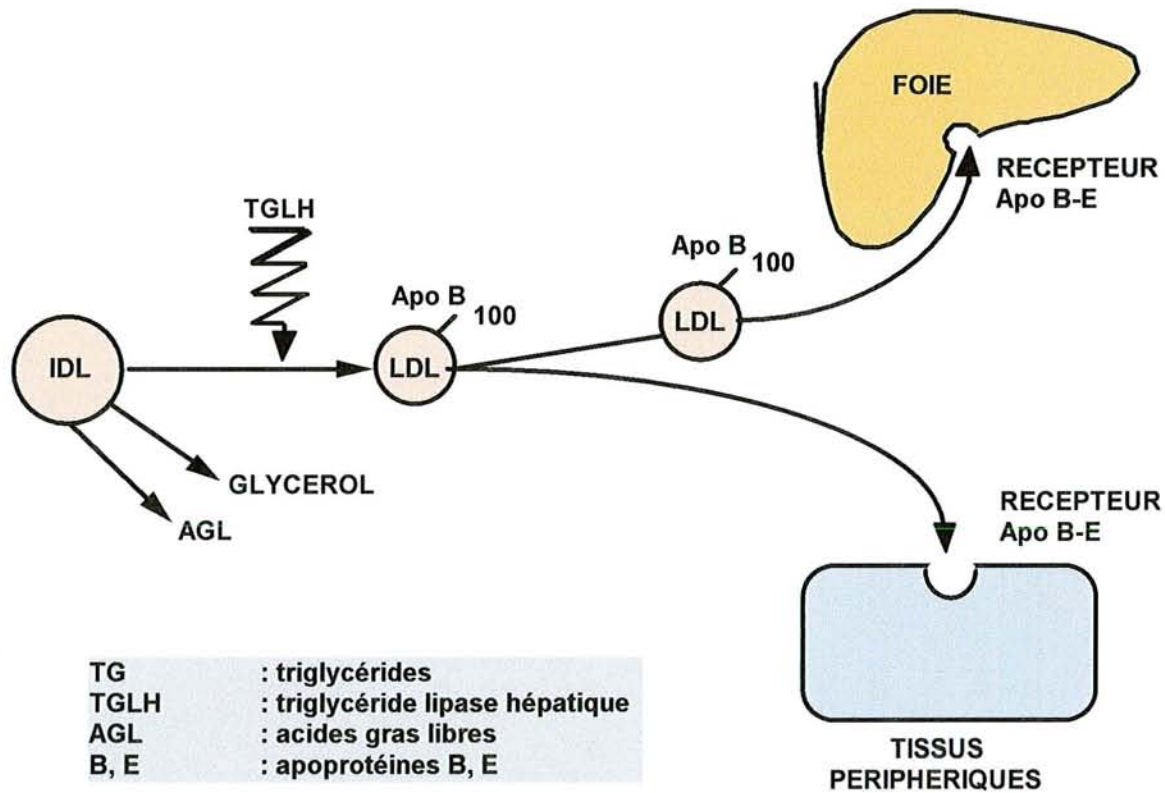
cholestérol des HDL qui reçoivent en retour des triglycérides. Ces différentes étapes aboutissent à la formation des LDL composées essentiellement d'apo B100 et d'esters de cholestérol. Ces lipoprotéines sont donc des transporteurs de cholestérol à destination des tissus périphériques (utilisation à des fins métaboliques) et du foie (épuration)(Figure 2).

**Figure 2 :  
Métabolisme des VLDL**



Les LDL assurent la distribution du cholestérol aux cellules grâce à un récepteur membranaire spécifique décrit par Goldstein et Brown (ou LDL récepteur ou récepteur à apo B100-E). Ce récepteur est ubiquitaire mais sa localisation principale est hépatique (70 p.100 des récepteurs des LDL sont situés au niveau du foie)(Figure 3).

**Figure 3 :  
Métabolisme des LDL**



Après internalisation, les LDL sont hydrolysées par les enzymes lysosomiales et l'apport de cholestérol libre dans la cellule est responsable :

- du rétrocontrôle de la synthèse et de la mobilisation des récepteurs des LDL
- de l'activation de l'*acyl CoA cholestérol acyl transferase* (ACAT) permettant le stockage du cholestérol intracellulaire sous forme estérifiée
- d'une rétrorégulation négative de l'activité de l'*HMG CoA reductase*, enzyme clé de la synthèse cellulaire du cholestérol.

Le cholestérol intracellulaire peut donc être stocké sous forme estérifiée ou être utilisé pour l'édification des membranes cellulaires. Certaines cellules ont des besoins en

cholestérol plus importants comme les hépatocytes pour la formation des composés biliaires ou certaines cellules endocrines pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes.

Un excès de cholestérol-LDL, en raison d'un déficit ou d'une saturation du système régulé du LDL récepteur, est athérogène. Dans ce cas, le cholestérol-LDL excédentaire est épuré par la voie non régulée des récepteurs "scavengers" des macrophages, première étape de la formation des plaques d'athérome.

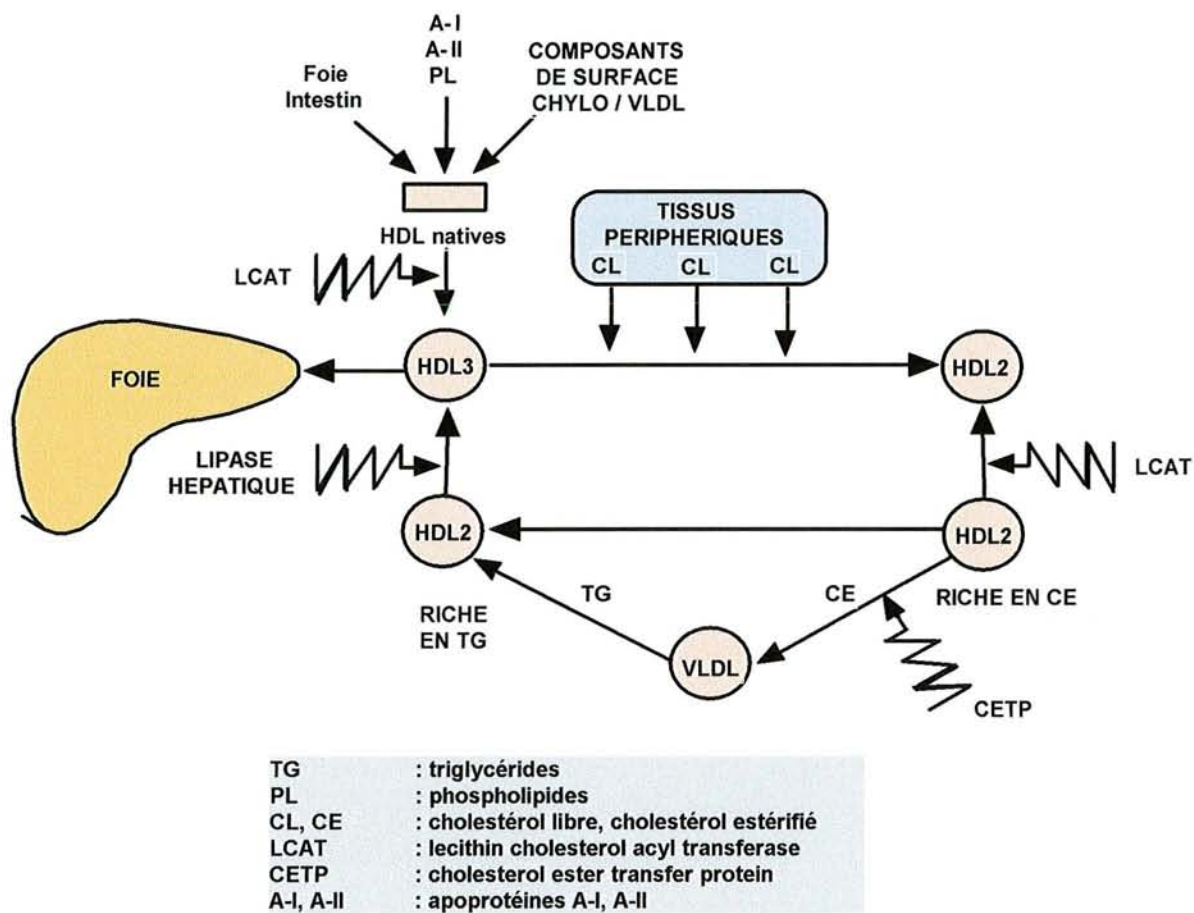
- **Les HDL (High Density Lipoprotein)**

Les HDL, dont l'apoprotéine majoritaire est l'apo A-I, constituent une classe hétérogène de lipoprotéines dont les deux fractions majoritaires sont les HDL2 et les HDL3. Cette classe de lipoprotéines joue un rôle considérable en captant du cholestérol tissulaire en excès pour le ramener au foie où il est éliminé par voie biliaire constituant ainsi le transport inverse du cholestérol. Les HDL naissantes, particules discoïdes, sont synthétisées par le foie et l'intestin, mais également à partir des constituants de surface libérés lors de la lipolyse des particules riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL). Le cholestérol libre de ces HDL discoïdales est estérifié sous l'action de la *Lecithin Cholesterol Acyl Transferase* (LCAT) dont le cofacteur indispensable est l'apo A-I. Les esters de cholestérol formés migrent au centre de la particule et transforment les HDL discoïdales en HDL3 sphériques. Celles-ci sont capables de recevoir du cholestérol libre cédé par les tissus périphériques (efflux du cholestérol cellulaire) qui est estérifié par la LCAT. Cet enrichissement en esters de cholestérol aboutit à la formation des HDL2.

Ces lipoprotéines ont des échanges complexes avec les lipoprotéines à apo B100 grâce à des protéines de transfert assurant l'échange de phospholipides (PLTP : *phospholipid transfer protein*), d'esters de cholestérol et de triglycérides (CETP) de façon physiologique. Ces transferts entraînent donc un enrichissement des HDL2 en

triglycérides et un appauvrissement en esters de cholestérol. Les HDL2 enrichies en triglycérides sont alors transformées en HDL3 sous l'action de la triglycéride lipase hépatique, constituant ainsi un cycle physiologique continu HDL3-HDL2 (Figure 4).

**Figure 4 :**  
**Métabolisme des HDL, enzymes et échanges lipidiques**



La captation du cholestérol membranaire par les HDL et son retour au foie par les lipoprotéines à apo B100 ou par les HDL elles-mêmes réalise ce que l'on appelle le transport inverse du cholestérol qui est éliminé par voie biliaire. Ce rôle d'épuration des HDL rend compte de leur action antiathérogène.



### **III - Physiologie des lipides et lipoprotéines plasmatiques en période postprandiale**

#### **1 - Physiologie de l'absorption digestive**

La prise alimentaire comporte trois phases : l'ingestion, la digestion et l'absorption. La digestion correspond à la phase luminale de l'absorption ou digestion intra-luminale. Elle comprend l'émulsification, l'hydrolyse et la solubilisation micellaire. Le type du repas et sa consistance (liquide et/ou solide) conditionnent la vitesse de vidange gastrique. Pour exemple, 15 à 30 p. 100 des lipides d'un repas mixte (solide et liquide) sont évacués chaque heure, suggérant que la vidange des lipides après un repas s'étale sur 6 à 8 heures selon une loi de type linéaire. La nature des aliments influence également la vitesse d'évacuation gastrique : le glucose la ralentit, les lipides exercent sur la vidange gastrique un rétro-contrôle négatif, les triglycérides d'acides gras à longues chaînes l'inhibant par des mécanismes nerveux et hormonaux, en particulier par la cholecystokynine.

La plus grande partie des lipides, fournie par l'absorption intestinale des aliments (voie exogène) arrive dans le plasma par voie lymphatique (canaux chylifères). Les chylomicrons sont excrétés dans l'espace inter-cellulaire par un phénomène de transport actif. Ils rejoignent la lymphe et la circulation lymphatique puis le canal thoracique et, de là, la circulation veineuse où ils sont responsables de la turbidité postprandiale du sérum. Cette hyperlipémie postprandiale est perceptible dans le plasma dès la 30ème minute suivant l'absorption du repas gras, et dure plusieurs heures. Elle peut ne pas être totalement terminée plus de 12 heures après un repas anormalement copieux, ou dans des situations pathologiques, comme l'obésité, le diabète ou les hyperlipidémies. Il en résulte que, pendant une grande partie des 24

heures, et même chez un sujet réputé être à jeun, les lipides demeurent anormalement élevés et sont le reflet d'un mélange en proportions variables de lipides exogènes et endogènes. Nous aborderons plus loin (chapitre IV-3, page 33) l'influence de l'alimentation (quantité et qualité des lipides, cholestérol alimentaire) sur la réponse lipidique postprandiale.

## **2 - Métabolisme des lipoprotéines en période postprandiale**

L'ingestion pluri-quotidienne de repas contenant en particulier des lipides alimentaires (essentiellement des triglycérides) à raison de 60 à 150 g/jour, va bouleverser l'équilibre lipidique observé à jeun. La lipémie postprandiale qui en résulte est un phénomène long, qui dure plusieurs heures, variable selon l'importance du repas et les individus étudiés [47,67]. Cet état postprandial doit être considéré comme l'état prépondérant du métabolisme lipidique chez l'Homme.

Le processus de digestion des lipides, malgré sa grande complexité, est très efficace chez le sujet sain en conduisant à l'assimilation d'environ 97 à 98 p. 100 des triglycérides ingérés, mais seulement 30 à 70 p. 100 du cholestérol. Après l'absorption intestinale des produits de digestion (acides gras libres, monoglycérides, lysophospholipides, cholestérol libre, vitamines liposolubles libres), des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol estérifié sont à nouveau synthétisés et ré-assemblés dans les entérocytes avec de l'apo B48 (48% de la partie N-terminale de l'apo B100, produite par un processus d'édition couplé à la transcription du gène) pour former les chylomicrons (CM). Ces particules lipoprotéiques de grande taille (100-500 nm) sont sécrétées au pôle basal des entérocytes dans la lymphe puis rejoignent la circulation par la voie des canaux chylifères. Ce flux de particules intestinales très riches en triglycérides (85 p. 100) est caractérisé par une élévation nette et transitoire

de la triglycéridémie, de la phospholipidémie et du cholestérol libre circulant et une baisse temporaire du cholestérol estérifié plasmatique [47,67]. Dans des conditions de repas physiologique, l'augmentation des triglycérides se situe généralement entre la 2ème et la 4ème heure avec un retour aux valeurs de base après environ 5 à 7 heures. Chez les sujets présentant des anomalies du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, ce phénomène sera amplifié et prolongé [240]. Compte tenu de la répétition des repas sur une journée, certains auteurs décrivent une onde de triglycéridémie depuis la première prise alimentaire du petit-déjeuner jusqu'à la dernière prise correspondant au dîner [118].

L'hydrolyse rapide de la majorité des triglycérides des chylomicrons par la lipoprotéine lipase, donne des résidus de chylomicrons de plus petite taille (appelés "remnants"). L'apo B48 ne possédant pas le site de reconnaissance pour le récepteur apo B/E, les remnants sont ensuite captés par le foie où trois récepteurs semblent intervenir : le récepteur B/E (ou récepteur des LDL) pour 50 p. 100 du catabolisme des remnants, le LRP (LDL-receptor Related Protein) et le LSR (Lipolysis Stimulated Receptor) dont l'activité dépendrait en particulier du type d'acides gras de l'alimentation [247]. Il faut noter dans tous les cas le rôle essentiel de l'apo E et de son polymorphisme génétique dans la modulation de fixation des remnants de chylomicron à ces différents récepteurs [21].

Au cours de l'état postprandial, les lipoprotéines riches en triglycérides d'origine hépatique (VLDL à apo B100) et celles d'origine intestinale (chylomicrons à apo B48) entrent en compétition pour l'hydrolyse par les mêmes lipases endo-vasculaires. Il en résulte un important phénomène de compétition pour l'hydrolyse des triglycérides pendant plusieurs heures suivant l'ingestion d'un repas [144]. La demie-vie très courte (environ 15 minutes) des chylomicrons dans la circulation rend compte de leur

traitement en priorité par les lipases endo-vasculaires qui les hydrolysent préférentiellement [26].

Grâce aux méthodes d'immuno-affinité développées dans le début des années 90, la responsabilité relative et respective des VLDL et des chylomicrons dans l'élévation postprandiale des lipoprotéines riches en triglycérides a été démontrée [46,203]. L'augmentation des triglycérides est globalement due pour moitié aux chylomicrons (effet direct lié à leur sécrétion) et pour moitié aux VLDL (effet indirect lié à la diminution de leur catabolisme et/ou à l'augmentation de leur synthèse). Ces mécanismes biochimiques amènent certains auteurs à parler paradoxalement de '*maladie hépatique*' pour qualifier les altérations du métabolisme lipidique postprandial.

L'état postprandial s'accompagne aussi de modifications de la composition des lipoprotéines circulantes. On observe ainsi habituellement un doublement de la concentration des triglycérides dans les lipoprotéines riches en triglycérides, une augmentation plus faible et plus tardive dans les HDL [58], et une diminution modérée de la concentration de triglycérides dans les LDL.

Dans le même temps, la concentration en cholestérol des lipoprotéines riches en triglycérides augmente sensiblement [25]. Inversement, la concentration en cholestérol diminue modérément dans les HDL et les LDL. Les HDL3 baissent et les HDL2 augmentent [225]. La diminution observée pour les LDL peut s'expliquer par une réduction de leur production à partir des VLDL mais peut-être aussi par une augmentation de leur captation par les tissus. La diminution du cholestérol-HDL résulte vraisemblablement d'une stimulation à la fois du transfert de cholestérol esterifié vers les lipoprotéines riches en triglycérides et de la captation hépatique des HDL en période digestive [225].

L'évolution des autres paramètres lipidiques (phospholipides, en particulier) est mal connue, mais il a été démontré que la concentration en phospholipides augmente précocément dans les lipoprotéines riches en triglycérides et plus tardivement dans les HDL [69,92,148]. Le transfert des phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides vers les HDL est sous le contrôle de la *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) [40]. Enfin, la concentration plasmatique en apo A-I n'est pas modifiée, celle de l'apo E ou des apo Cs est nettement augmentée dans le plasma en période postprandiale [48]. L'apo C-III et les lipoparticules contenant de l'apo C-III (LpB/C-III) semblent constituer de bons marqueurs du métabolisme lipidique postprandial chez des sujets normolipidémiques [8].

L'ensemble des paramètres du métabolisme lipidique est ainsi modifié en période postprandiale, suite à la synthèse et à la libération de chylomicrons dans la circulation, entraînant un remodelage très important des autres lipoprotéines circulantes. La signification physiopathologique de ces modifications lipidiques est complexe à analyser, la frontière entre la physiologie et la pathologie n'étant pas clairement définie au cours de ces situations dynamiques.

## IV - Caractéristiques principales de la lipémie postprandiale

### 1 - Situations cliniques influençant la réponse lipidique postprandiale

La lipémie postprandiale présente une importante variabilité liée à l'influence de nombreux paramètres clinico-biologiques que l'on a pu mettre en évidence.

- **L'âge**

L'âge est un facteur à prendre en compte dans l'analyse du métabolisme lipidique postprandial. Une altération significative de l'épuration lipidique postprandiale après 50 ans a été montrée par Krasinski *et col.* dans une population de 86 sujets témoins [140], confirmant ainsi les travaux préliminaires de Cohn *et col.* [47]. Cette notion de réponse lipidique postprandiale dépendante de l'âge est également observée au sein de populations atteintes de pathologie coronaire [212].

- **L'origine ethnique**

Les hommes de race noire auraient un profil lipidique postprandial plus favorable que leurs homologues de race blanche, avec des paramètres cliniques et biologiques à jeun similaires. La différence est très probablement liée à des activités spécifiques de la lipoprotéine lipase et de la triglycéride lipase hépatique [81].

- **Le sexe**

Certaines données ont conduit classiquement à considérer que les hommes ont un métabolisme lipidique postprandial moins efficace que celui des femmes, ce qui serait lié à des activités lipasiques plus faibles (lipoprotéine lipase en particulier). Peu d'études ont réellement étudié l'impact que pouvait représenter le genre masculin ou féminin sur les paramètres lipidiques postprandiaux. La première étude datant de 1980 par Baggio *et col.* [18], montrait que la réponse des triglycérides postprandiaux n'étaient pas significativement différente entre les 6 hommes et les 6 femmes de

l'étude. Même après des adaptations nutritionnelles du repas d'épreuve lipidique, certains auteurs n'ont pas rapporté de différence de réponse métabolique postprandiale entre les hommes et les femmes [185].

L'étude de Cohn *et col.* [47] qui fait référence depuis bientôt 10 ans, n'observait qu'une tendance non significative à une moins bonne épuration lipidique chez les hommes comparativement aux femmes. Heller *et col.* [113] rapportent pourtant que les triglycérides postprandiaux sont différents entre une population de 13 hommes comparée à celle de 7 femmes, mais des différences sont déjà notées à l'état basal, avec en particulier un indice de masse corporelle (IMC) et des triglycérides plus faibles chez les femmes, et un cholestérol-HDL plus élevé. Ryu *et col.* [195] ont étudié 16 hommes et 13 femmes et n'ont rapporté aucune relation entre le métabolisme des lipides postprandiaux et le sexe. Enfin, Krasinski *et col.* [140] n'ont pas retrouvé de différence de métabolisme postprandial des esters de rétinol, utilisés comme marqueurs spécifiques du métabolisme des chylomicrons, dans une population de 59 sujets sains (28 hommes et 31 femmes). Ainsi, si certaines différences sont observées entre les hommes et les femmes, elles sont le fait de spécificités cliniques et/ou biologiques pré-existantes à jeun et dont l'influence sur la réponse lipidique postprandiale est clairement établie.

A des niveaux de triglycérides et de cholestérol-HDL à jeun identiques, et après appariement des hommes et des femmes sur la quantité de tissu adipeux viscéral, aucune différence de réponse lipidique postprandiale n'est observée [51]. Ce n'est pas le cas lorsque l'appariement ne porte que sur la masse grasse totale ou la masse grasse sous-cutanée.

- **Période d'activité génitale et ménopause : rôle des oestrogènes**

Les femmes jeunes en période d'activité génitale ont un métabolisme lipidique postprandial plus favorable que leurs homologues ménopausées. Après ajustement sur l'âge, l'IMC, le rapport taille/hanche et les triglycérides à jeun, la réponse postprandiale en triglycérides et palmitate de rétinol de la fraction chylomicron est altérée chez la femme ménopausée comparée à la femme non ménopausée [232]. Sous traitement hormonal substitutif, on observe une réduction de plus de 40 p. 100 des concentrations postprandiales de palmitate de rétinol dans les chylomicrons, alors que les concentrations de triglycérides et de cholestérol-HDL à jeun ne sont pas significativement modifiées [243].

- **L'exercice physique**

Il n'est pas aisé de distinguer les effets respectifs sur le métabolisme lipidique d'un exercice physique pratiqué de façon aiguë comparativement à un entraînement chronique.

L'exercice physique régulier intervient sur les triglycérides à jeun et la réponse lipidique postprandiale, ainsi que sur la concentration de HDL2 [105]. L'amplitude des triglycérides postprandiaux est donc logiquement plus faible chez les athlètes [-31 p. 100 de l'aire sous la courbe (ASC)] et la clairance des triglycérides est accélérée [5]. Les athlètes réguliers ont le plus souvent une masse musculaire plus développée, et leur composition corporelle est significativement différente de celle de sujets sédentaires, même après appariement sur le poids, ou l'indice de masse corporelle. Cette masse musculaire et la densité capillaire plus importante sont autant de facteurs qui expliquent l'augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase de l'ordre de 35 à 45 p. 100 [133]. Enfin, une proportion plus élevée de fibres de type 1 à haut pouvoir d'oxydation des acides gras est observée chez l'athlète.



En aigu, l'effet de l'exercice physique dépend surtout de l'intervalle de temps entre la réalisation de cette activité physique et la phase postprandiale. Une épreuve d'hyperlipémie provoquée réalisée dans les suites d'un exercice se traduit par une augmentation postprandiale plus marquée des triglycérides plasmatiques dès la 4ème heure [134]. La diminution de la perfusion hépatique et splanchnique observée au cours de l'exercice physique explique en partie ces résultats paradoxaux. A l'inverse, la triglycéridémie à jeun est plus faible le lendemain matin de l'exercice physique (- 26%) et l'activité de la lipoprotéine lipase est plus élevée (46%)[199].

## **2 - Facteurs prédictifs de la réponse lipidique postprandiale**

Il a été établi que l'amplitude de la lipémie postprandiale est corrélée positivement à la triglycéridémie et aux VLDL à jeun [149] ainsi qu'à l'apo C-III (l'apo C-III est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase) à jeun. A l'inverse, elle est négativement corrélée au cholestérol-HDL (en particulier au HDL2)[176,178], à l'activité de la lipoprotéine lipase et à l'apo C-II (activateur de la lipoprotéine lipase) à jeun.

Certains travaux suggèrent cependant que les triglycérides à jeun sont des indices de sensibilité médiocre dans la prédiction de la réponse lipidique post-prandiale (47%) malgré leur caractère hautement spécifique (98,9%)[205]. Dans des modèles d'analyses multivariées, les triglycérides plasmatiques à jeun sont au plus prédicteurs de 26 à 60 p. 100 de la variance des paramètres lipidiques postprandiaux. D'autres données laissent à penser que des facteurs génétiques jouent un rôle primordial dans l'épuration lipidique. Cependant, un pourcentage élevé de la variation inter-individuelle de la réponse lipidique postprandiale reste encore inexpliqué [221]. Des mutations sur des protéines jouant un rôle fonctionnel ou régulateur dans le métabolisme lipidique peuvent amplifier la réponse postprandiale. C'est le cas par exemple de la lipoprotéine

lipase, de l'apo E [186] (en particulier les géotypes e2/e2 et e4/e4) ou du récepteur apo B/E.

### **3 - Effets des nutriments sur la lipémie postprandiale**

- **Les lipides**

Des données assez anciennes suggéraient que des quantités ingérées croissantes de triglycérides entraînaient une augmentation proportionnelle de la triglycéridémie postprandiale [43]. Des données récentes ont établi précisément cette relation dans des conditions physiologiques après des repas mixtes chez l'Homme [67]. Ainsi, si une quantité de 15 g de triglycérides ne modifie pas notablement les paramètres lipidiques en période postprandiale, des quantités plus élevées (30, 40 ou 50 g/repas) entraînent des modifications dose-dépendantes de tous les paramètres étudiés (triglycéridémie, phospholipidémie, cholestérol libre et estérifié, cholestérol libre LDL, etc.).

Quelques approches comparables ont été réalisées avec le cholestérol alimentaire. Si une dose de 140 mg/repas n'induit pas de modification plus importante qu'un apport nul de cholestérol alimentaire, des quantités de 280 et 710 mg augmentent modérément la triglycéridémie et modifient quelques autres paramètres (phospholipides, cholestérol libre et estérifié, cholestérol libre et estérifié des LDL et HDL)[68].

La nature des triglycérides du repas peut également influencer la réponse lipidique postprandiale, mais les résultats des études sont parfois contradictoires [244]. Certaines données suggèrent que les triglycérides riches en acides gras saturés entraînent une triglycéridémie postprandiale plus élevée que les triglycérides riches en acides gras monoinsaturés ou polyinsaturés de la série n-6 [20]. D'autres données par contre ne mettent pas en évidence de telles différences ou tendent à montrer des

résultats opposés. Notons les cas de lipides apportés sous forme très peu digestible (saindoux) ou de sources de composition et de structure physico-chimique particulière (beurre) dont la digestion et/ou l'assimilation particulières peuvent donner des réponses postprandiales non usuelles. Il semble que des chylomicrons enrichis en acides gras monoinsaturés ou polyinsaturés soient de plus grande taille, ce qui favoriserait leur catabolisme. Les triglycérides riches en acides gras de la famille n-3 [acide eicosapentanoïque (EPA) et acide docosahexanoïque (DHA)] peuvent induire des réponses postprandiales de moindre amplitude [242], et ceci à niveau et répartition caloriques en lipides identiques.

On doit aussi souligner que plusieurs études ont établi que la composition en acides gras du régime alimentaire des sujets avant l'épreuve peut influencer l'amplitude de la réponse postprandiale à un repas lipidique standard [35].

On peut considérer que la nature des acides gras du régime et/ou du repas test influence dans une certaine mesure la réponse postprandiale chez le sujet sain. Ces variations semblent cependant beaucoup moins marquées que les différences que l'on peut observer, pour un même repas test, entre des sujets sains et des sujets présentant des anomalies du métabolisme lipidique postprandial.

- **Les glucides**

Deux grands types de glucides alimentaires ont été étudiés, d'une part les glucides digestibles comme le glucose, le fructose ou des amidons, et d'autre part les glucides indigestibles sous la forme de fibres alimentaires isolées ou en mélange.

Pour ce qui est des glucides digestibles, le glucose tend à diminuer l'amplitude de la triglycéridémie postprandiale tandis que les effets des amidons restent à déterminer plus précisément. Par contre, des données concordantes montrent que le fructose [44], et à un degré moindre le saccharose [91], amplifient notablement la

réponse postprandiale. Ces effets pourraient résulter d'une augmentation de la synthèse hépatique des VLDL susceptible d'inhiber la lipolyse endo-vasculaire des chylomicrons [123]. Si les études comparant les effets de repas test contenant des proportions variables de glucides et de lipides montrent des différences de réponses mesurables, il est encore difficile de résumer de façon simple ces interactions. Pourtant, des régimes alimentaires très riches en glucides tendent à induire des réponses postprandiales exacerbées [118]. Il en est de même si l'on compare les réponses lipidiques postprandiales après l'ingestion de repas isocaloriques mais à index glycémiques différents. Le repas test dont l'index glycémique est le plus élevé augmente significativement l'amplitude de réponse postprandiale des lipoprotéines riches en triglycérides, comparativement à un repas à index glycémique faible, ou dépourvu de glucides [104]. Les glucides alimentaires interfèrent aussi sur le métabolisme des lipides en période postprandiale, vraisemblablement à travers leurs effets sur l'insulinémie et le métabolisme hépatique.

- **Les fibres alimentaires**

La grande majorité des travaux destinés à étudier l'influence des fibres alimentaires a montré que l'addition de fibres à un repas test, en particulier des fibres solubles augmentant la viscosité (son d'avoine, pectine, psyllium, gomme de guar), tendent à réduire l'amplitude de la réponse postprandiale, et plus spécifiquement celle des chylomicrons [143], mais certaines études ont observé des effets contraires [185]. Ces effets aigus seraient essentiellement liés à l'action des fibres alimentaires sur la vidange gastrique, sur l'émulsification, sur la digestion et sur l'absorption intestinale des lipides. Un effet indirect à travers la réponse insulinique postprandiale n'est pas à exclure.

- **L'alcool**

L'alcool a de multiples effets sur le métabolisme des lipoprotéines. Ces effets dépendent de la quantité consommée et de la durée d'exposition à l'alcool. Une quantité modérée d'alcool peut entraîner une élévation considérable de la triglycéridémie, la susceptibilité individuelle étant très variable. Cette réponse est exagérée chez les sujets présentant déjà une hypertriglycéridémie. Le mécanisme d'action de l'alcool sur les lipoprotéines plasmatiques reste controversé. Une diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides est évoquée, de même qu'une augmentation de la synthèse de ces lipoprotéines au niveau hépatique et/ou intestinal. L'alcool pourrait potentialiser la sécrétion de VLDL d'origine hépatique. L'activité de la lipoprotéine lipase ne semble pas affectée [107], mais d'autres études ne l'ont pas confirmée. Inversement, celle de la triglycéride lipase hépatique serait altérée.

Ainsi, une prise régulière de 40 g d'alcool pendant 3 semaines se traduit par une altération du métabolisme lipidique postprandial [108]. Les lipoprotéines riches en triglycérides non épurées sont la cause de cette hypertriglycéridémie.

- **Le tabac**

La consommation de tabac est un élément perturbant du métabolisme lipidique, pas seulement sur les paramètres à jeun, mais également en période postprandiale où la réponse lipidique est exacerbée [160]. L'amplitude d'augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides est plus marquée, et associée à une diminution du cholestérol-HDL chez le fumeur. Ces altérations sont liées à des modifications d'activité des protéines de transfert des lipides [161]. La diminution de la sensibilité à l'insuline rapportée chez les fumeurs [71], mais aussi la notion d'une vidange gastrique ralentie chez ces sujets, constituent des causes potentielles aux altérations du métabolisme lipidique postprandial du fumeur.

## **V - Altérations du métabolisme lipidique postprandial et risque vasculaire**

### **1 - Triglycéridémie à jeun et athérosclérose**

Une méta-analyse récente a démontré que les triglycérides à jeun sont un facteur indépendant de risque de maladies cardiovasculaires [15]. Après ajustement sur d'autres facteurs de risque (en particulier sur le cholestérol-HDL), une augmentation du risque relatif de 14 p. 100 chez l'homme et de 37 p. 100 chez la femme est observée pour chaque augmentation de 1 mmol/l de triglycérides. Dans une étude prospective menée sur 8 ans, la concentration de triglycérides à 1,33 mmol/l (soit 1,17g/l) constituerait un seuil de risque cardiovasculaire [121].

### **2 - Lipides postprandiaux et athérosclérose**

Dans la mesure où les travaux menés chez l'animal ont démontré que les remnants de chylomicrons entraînent au moins autant de dépôts lipidiques vasculaires que les LDL [155], toute perturbation du métabolisme postprandial des lipoprotéines riches en triglycérides est potentiellement athérogène, ce que confirment des études cliniques [132]. Patsch *et col.* [177] ont été les premiers à démontrer le rôle indépendant des triglycérides postprandiaux chez des hommes atteints de coronaropathie. En analyse multivariée, l'âge, la concentration d'apo B totale, le cholestérol-HDL2 ainsi que les triglycérides 4 heures et 8 heures après l'ingestion du repas sont corrélés, de manière indépendante à la présence d'une atteinte coronaire. Pour Weintraub *et col.* [241], c'est l'évolution postprandiale du palmitate de rétinol (RP)(marqueur vitaminique des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale) de la fraction non-chylomicron

qui est altérée chez les coronariens, et ceci après ajustement sur les triglycérides et le cholestérol-HDL initialement différents entre les coronariens et les témoins. Ces deux études ont le mérite de considérer les résultats postprandiaux en tenant compte des concentrations de lipides à jeun, ce qui était rarement le cas pour les études antérieures à 1987.

Dans les années 90s, les études ont porté sur des populations atteintes de maladies cardiovasculaires ou à risque de les développer [93,166,209]. Ces populations se caractérisaient par un bilan lipidique à jeun le plus souvent perturbé, et susceptible de se détériorer de façon marquée après l'ingestion d'un repas riche en lipides. Soit les concentrations de triglycérides plasmatiques étaient initialement élevées et/ou le cholestérol-HDL abaissé [171,176,178], soit le rapport cholestérol-LDL / cholestérol-HDL était supérieur à 5 [93,177,210], ce qui constitue un marqueur de risque cardiovasculaire selon l'étude PROCAM [9]. Cette approche a eu le mérite de démontrer l'influence et le caractère pronostic des lipides à jeun sur la réponse lipidique postprandiale.

Ceci souligne l'intérêt des études récentes conduites chez des descendants normolipidémiques de patients atteints de coronaropathie. Comparativement à des descendants d'un groupe contrôle, les concentrations de triglycérides aux temps tardifs à partir de la 8ème heure après ingestion du repas test sont significativement plus élevées chez les descendants de coronariens [230]. Par contre, Slyper *et col.* n'ont pas observé de différences dans les concentrations de triglycérides et de palmitate de rétinol mesurés dans le plasma et les sous-fractions lipidiques dans une population présentant une histoire familiale de coronaropathie [212]. Cette discordance de résultats pourrait être liée à un recrutement plus faible de patients et de témoins dans la seconde étude.

Chez des femmes normolipidémiques d'âge moyen, et suspectes d'atteinte coronaire, la présence d'une coronaropathie est indépendante de l'évolution lipidique postprandiale. De même, chez des diabétiques de type 2 normolipidémiques, l'analyse des lipides postprandiaux n'est pas discriminante entre les patients atteints ou non de coronaropathie [220]. Ces résultats mettent l'accent sur la controverse concernant les relations entre les altérations du métabolisme postprandial et le développement de l'athérosclérose (**Tableau 1**) [128].

Concernant les autres territoires vasculaires, en particulier ceux à destination céphalique, Ryu *et col.* retrouvent une relation positive entre les altérations de l'épuration lipidique postprandiale et l'épaisseur artérielle des parois carotidiennes mesurée par échographie [195]. Boquist *et col.* observent une relation entre les altérations lipidiques postprandiales et l'épaisseur intima-média chez des sujets témoins d'âge moyen, indemnes de coronaropathie [32].



**Tableau 1** : Principales études sur le rôle athérogène des altérations du métabolisme lipidique postprandial

Référence	Type d'étude	Groupes étudiés (n)	Résultats postprandiaux
[210]	cas-témoins	34 coronariens/18 témoins	↑ LRT-TG
[93]	cas-témoins	20 coronariens/20 témoins	↑ TG et RP (plasma et LRT)
[177]	cas-témoins	61 coronariens/40 témoins	↑ TG plasma à 6, 8 h
[132]	transversale angiographique	32 post-infarctus/10 témoins	corrélation LRT-apo B48 et score angiographique à 5 ans
[230]	cas-témoins	80 hommes jeunes avec histoire familiale de coronaropathie/ 55 témoins	↑ TG à 8-12 h
[117]	cas-témoins	21 coronariens NTG et HTG / 10 témoins	TG similaires pour les HTG coronariens et HTG témoins
[88]	cas-témoins	50 (26H, 24F) coronariens/ 155 (66H, 89F) témoins	↑ TG plasma chez les hommes
[241]	cas-témoins	85 coronariens/85 témoins	pas de différence sur les TG ↑ ASC RP (nCM)
[212]	cas-témoins	60 hommes avec histoire familiale de coronaropathie/ 41 témoins	aucune différence
[32]	témoins	épaisseur intima-média (EIM) 96 sujets	relation EIM et ASC TG, ASCi TG, VLDL 3h
[131]	cas-témoins	14 coronariens NTG et 10 HTG/ 33 témoins NTG et 15 HTG	↑ LRT apo B100

**Légende** : TG : triglycérides; CT : cholestérol total; LRT : lipoprotéines riches en TG; NTG : normotriglycéridémique; HTG : hypertriglycéridémique; RP : palmitate de rétinol; ASC : aire sous la courbe; ASCi : ASC incrémentale; CM : chylomicron; nCM: non chylomicron; VLDL : very-low density lipoprotein; PL : phospholipides

## VI - Altérations du métabolisme lipidique postprandial et maladies métaboliques

### 1 - Lipides postprandiaux, obésité et insulino-résistance

Plusieurs études ont rapporté des anomalies du métabolisme lipidique postprandial chez des sujets obèses [148,234], qui à jeun présentaient une augmentation des triglycérides plasmatiques et une diminution du cholestérol-HDL, en particulier du HDL2.

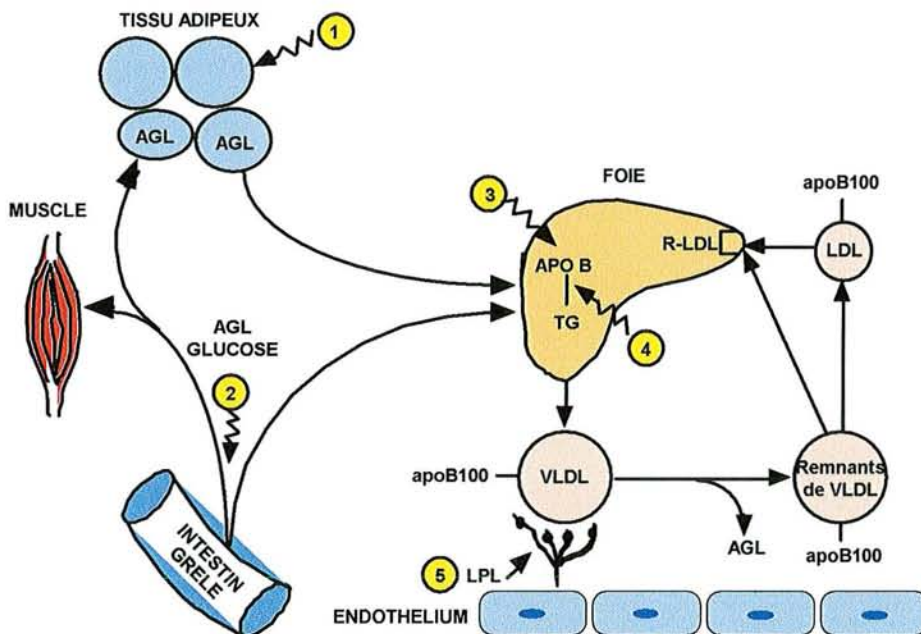
L'hyperinsulinisme et/ou la diminution de la sensibilité à l'insuline seraient impliqués dans les anomalies postprandiales de l'obèse. L'insuline joue en effet un rôle central par son action sur les activités lipasiques (en particulier la lipoprotéine lipase), mais aussi par son action sur les tissus cibles hépatique et adipocytaire. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipolyse des triglycérides stockés dans les adipocytes, et favorise parallèlement leur synthèse *in situ*, ce qui entraîne une diminution de la concentration circulante des acides gras libres. L'insuline possède une action freinatrice post-traductionnelle sur la synthèse endogène d'apoprotéine B et un effet inhibiteur sur l'assemblage intra-hépatocytaire des VLDL-TG. L'insuline stimule l'action de la lipoprotéine lipase, enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides.

Schrezenmeier *et col.* retrouvent chez les sujets *mauvais épurateurs* postprandiaux, des insuliniémies significativement plus élevées à jeun que chez les *bons répondeurs* [205]. Cependant, en se basant sur une méthode de clamp euglycémique-hyperinsulinique (à 550 pmol/l d'insulinémie moyenne plasmatique pendant 3 heures), Harbis *et col.* démontrent que l'hyperinsulinisme seul n'affecte pas le métabolisme lipidique postprandial [104].

La diminution de la sensibilité à l'insuline communément associée à l'obésité et la répartition abdominale du tissu adipeux pourrait jouer un rôle majeur. Une relation étroite entre le '*steady state plasma glucose*' (indice d'insulinosensibilité) et l'amplitude postprandiale des triglycérides et du palmitate de rétinol a été démontrée chez des patients obèses non diabétiques, suggérant que le défaut d'épuration lipidique s'inscrit comme élément du syndrome d'insulinorésistance [122]. Couillard *et col.* démontrent dans une étude très élégante que les différences d'épuration lipidique attribuées au sexe ne sont que le reflet des différences existant dans la répartition du tissu adipeux abdominal viscéral [51]. Mekki *et col.* confirment que seules les femmes androïdes, qu'elles soient normo- ou hypertriglycéridémiques, ont des altérations du métabolisme postprandial portant sur les lipoprotéines riches en triglycérides [159].

Au cours de l'obésité, une augmentation de production des VLDL et/ou un déficit du catabolisme de ces lipoprotéines sont suspectés et reliés à une diminution de la sensibilité à l'insuline, en particulier hépatique [153,187,214]. Un afflux d'acides gras libres au niveau du foie favorise cette synthèse hépatique de VLDL-TG, survenant tardivement 6 heures après l'ingestion d'un repas test [24]. Les acides gras peuvent provenir de la lipolyse des triglycérides stockés dans le tissu adipeux, mais aussi d'un afflux d'acides gras libres provenant de l'hydrolyse des chylomicrons par la lipoprotéine lipase [79]. L'effet freinateur de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire est en effet réduit dans les situations d'insulinorésistance. Le phénomène de compétition pour la lipoprotéine lipase entre les chylomicrons et les VLDL favorise l'accumulation des VLDL, la lipoprotéine lipase à la surface des capillaires de la cellule endothéliale agissant préférentiellement sur les chylomicrons (**Figure 5**).

**Figure 5 :**  
**Résistance tissulaire à l'action de l'insuline et métabolisme lipidique postprandial**



### Légende

- 1 - afflux d'acides gras libres secondaire à la baisse de l'inhibition de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux (levée de l'effet inhibiteur anti-lipolytique de l'insuline)
- 2 - diminution de la captation des acides gras libres par les tissus musculaires et adipeux : afflux d'acides gras libres et de glucose vers le foie (période postprandiale tardive)
- 3 - levée de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la sécrétion d'apo B (effet post-traductionnel sur l'apo B naissante)
- 4 - levée de l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'assemblage intrahépatocytaire des VLDL-TG : augmentation de la sécrétion de VLDL-TG
- 5 - diminution de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL-TG par la lipoprotéine lipase insulino-dépendante

## 2 - Lipides postprandiaux et diabète

### • Hyperglycémie à jeun et intolérance au glucose

Les caractéristiques postprandiales des sujets intolérants au glucose (ITG) sont assez superposables à celles de patients obèses androïdes non diabétiques, quoique plus caricaturales. Dans l'étude de Grosskopf *et col.*, les intolérants au glucose avaient des triglycérides plus élevés, mais une concentration de cholestérol-HDL similaire. Leurs

réponses lipidiques postprandiales (triglycérides et palmitate de rétinol) sont amplifiées comparativement à une population témoin [94]. On ne dispose pas de données sur le métabolisme lipidique postprandial des sujets présentant une hyperglycémie modérée à jeun.

- **Diabète de type 2**

Chez le diabétique de type 2, les marqueurs prédictifs de la réponse lipidique sont le plus souvent anormaux. L'augmentation modérée des triglycérides à jeun classiquement rencontrée au cours du diabète de type 2 favorise les anomalies de la cinétique d'épuration postprandiale [149]. Les profils plasmatiques de palmitate de rétinol et d'apoprotéine B48 sont aussi perturbés au cours du diabète de type 2 dans l'ensemble des études [52,69,149]. Cependant, des travaux ont démontré qu'à concentrations de triglycérides à jeun identiques, les diabétiques de type 2 se différenciaient des obèses non diabétiques par une cinétique ralentie du catabolisme des triglycérides plasmatiques [186]. Ces altérations du métabolisme lipidique postprandial observées chez le patient diabétique de type 2 comparativement au non diabétique ne peuvent donc pas s'expliquer uniquement par un 'pool' trop important de particules riches en triglycérides à l'état basal.

Les activités lipasiques, en particulier l'activité de la lipoprotéine lipase, ont un rôle majeur dans l'épuration des particules riches en triglycérides. Sous dépendance insulinique, elles sont par conséquent perturbées au cours du diabète de type 2. L'insulinorésistance qui caractérise le diabétique de type 2 semble être un des déterminants de la réponse lipidique postprandiale, mais l'insulinopénie relative que traduit un état d'hyperglycémie peut également influencer la lipoprotéine lipase dont l'activité est insulino-dépendante. L'obésité pourrait jouer un rôle aggravant propre, en particulier l'obésité androïde [51]. La réponse lipidique postprandiale est en effet

accentuée et retardée chez les sujets obèses comparativement à des sujets sains [148].

- **Diabète de type 1**

Le diabète de type 1 se caractérise par un profil lipidique conventionnel le plus souvent normal. La réponse des triglycérides postprandiaux ne diffère pas entre des diabétiques de type 1 et des témoins, analysés séparément chez les hommes et les femmes [83]. La réponse lipidique n'est pas influencée par un déséquilibre glycémique transitoire, seuls les acides gras libres postprandiaux des patients diabétiques de type 1 mal équilibrés sont élevés, témoignant de leur degré d'insulinopénie [147]. La composition lipidique des particules HDL n'est pas non plus altérée à la suite de l'ingestion d'un repas test chez des patients diabétiques de type 1 équilibrés sur le plan glycémique [146]. Un enrichissement en cholestérol des lipoprotéines riches en triglycérides, modifications majorées en période postprandiale est par contre classiquement décrit au cours du diabète de type 1. Le rôle athérogène potentiel de ces anomalies lipidiques postprandiales reste à démontrer. Elles semblent corrigées par une insulinothérapie optimisée plus physiologique par voie intra-péritonéale [84,85].

### **3 - Lipémie postprandiale au cours des dyslipidémies**

Peu d'études ont évalué la répercussion d'une charge orale en lipides chez des patients présentant initialement une dyslipidémie. L'étude de Weintraub *et col.* [240] a clairement établi en 1987 que les patients avec une hypertriglycéridémie à jeun, se caractérisaient par une multiplication par un facteur 5 au moins de leur niveau de triglycérides en période postprandiale. La répercussion métabolique est plus modeste

chez les patients atteints d'hyperlipidémie de type IIa ou d'hyperlipidémie familiale combinée [39].

## **VII - Facteurs d'athérogénicité du métabolisme lipidique postprandial**

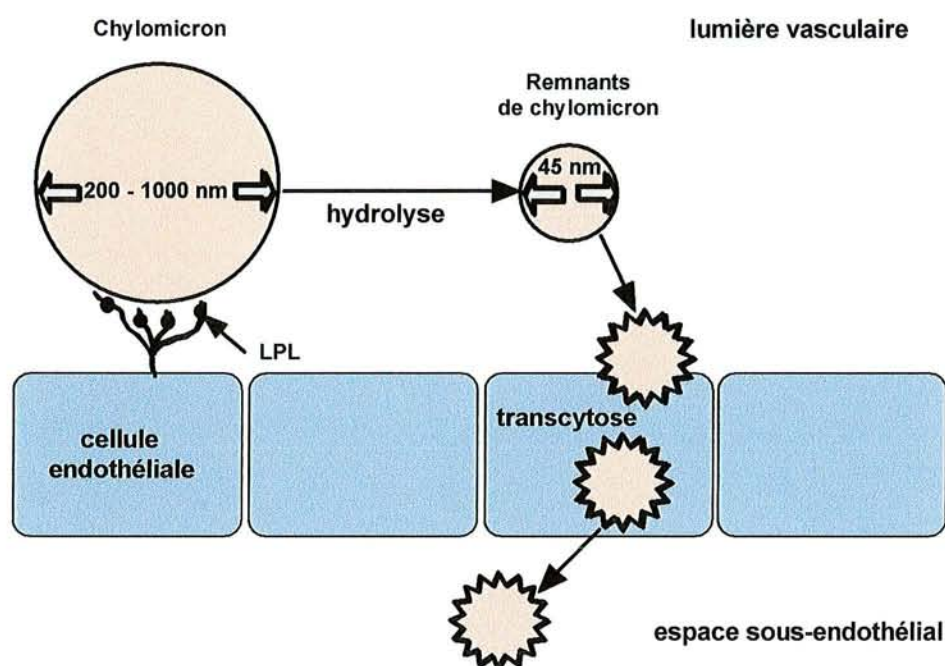
### **1 - Remnants de chylomicrons, VLDL ou remnants de VLDL**

Sur le plan expérimental, les anomalies du métabolisme des remnants de particules riches en triglycérides semblent porter une lourde responsabilité dans le risque cardiovasculaire. Des particules riches en triglycérides ont été détectées dans les plaques d'athérome, favorisant la captation des esters de cholestérol provenant des remnants de lipoprotéines riches en triglycérides au niveau de la paroi artérielle.

La taille des lipoprotéines reste pourtant un élément primordial car elle conditionne la capacité des lipoprotéines à pénétrer la paroi intima. Les chylomicrons et VLDL natives ont un diamètre trop important pour pénétrer l'intima. Seules les lipoprotéines d'un diamètre de 45 nm maximum ont le pouvoir de traverser la paroi artérielle par un mécanisme de transcytose [170] (**Figure 6**).

Chez l'Homme, une proportion élevée de remnants de chylomicrons est catabolisée avant qu'ils n'atteignent une taille leur permettant de pénétrer l'intima [87], les remnants de lipoprotéines riches en triglycérides d'origine hépatique constituant alors des acteurs physiopathologiques de premier plan.

**Figure 6 :**  
**Transcytose des lipoprotéines dans la paroi vasculaire**



Compte tenu de la cinétique respective des lipoprotéines plasmatiques (demi-vie), la quantité de cholestérol circulant quotidiennement dans l'organisme est trois fois plus importante lorsque celui-ci est lié aux chylomicrons comparativement aux LDL [155]. Cependant, la quantité relative de cholestérol lié à des lipoprotéines riches en triglycérides contenant de l'apo B48, est très faible comparativement aux autres types de lipoprotéines potentiellement athérogènes, que ce soit à jeun ou en période postprandiale. A partir d'une détection immunologique des remnants de lipoprotéines plasmatiques riches en cholestérol (LRP : remnant-like particles [165]), Karpe *et col.* ont récemment rapporté l'existence d'une relation étroite entre les concentrations de ces lipoprotéines athérogènes et l'épaisseur intima-média dans une cohorte de 50 hommes d'âge moyen [130].

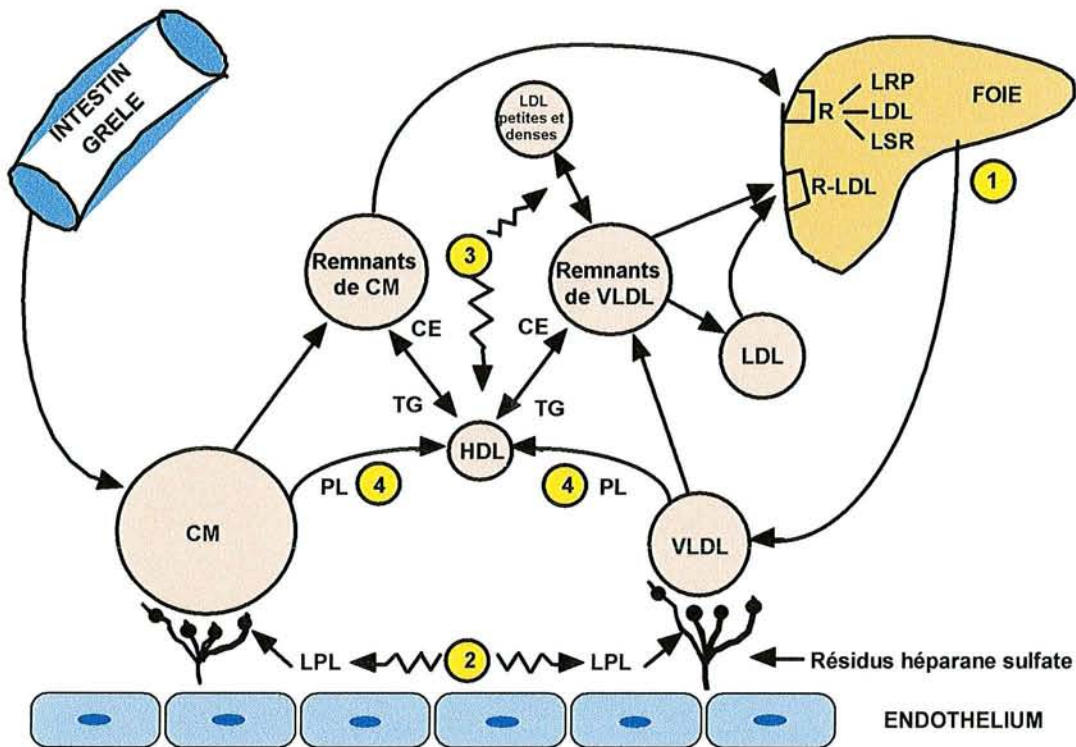
Basée sur les mesures d'apo B48 et d'apo B100, la prédominance respective des lipoprotéines riches en triglycérides intestinales ou hépatiques en période



postprandiale reste débattue. Deux études retrouvent un rapport élevé apo B48/apo B100 dans les lipoprotéines riches en triglycérides de sujets coronariens comparés à des témoins [162,209], indiquant que les patients présentaient une accumulation de chylomicrons, mais les différences s'annulent après ajustement sur les lipides à jeun. D'autre part, une étude récente de Karpe *et col.* menée chez des coronariens normo- et hypertriglycéridémiques, démontre que l'accumulation de triglycérides dans les temps tardifs de la phase postprandiale est liée à la persistance de lipoprotéines riches en triglycérides endogènes [131]. Plusieurs auteurs s'accordent ainsi pour observer que la concentration relative de lipoprotéines riches en triglycérides d'origine endogène reste largement prédominante à jeun mais également en période postprandiale comparativement aux lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale.

Par analogie, les résultats obtenus chez le sujet diabétique de type 2 soumis à des régimes variables d'hydrates de carbone sont révélateurs. Sous 55 p. 100 de glucides (versus 40 p. 100) de la ration calorique globale, la concentration totale de VLDL-TG est augmentée, consécutivement à une augmentation de production et à une diminution du catabolisme des VLDL-TG [118]. La cinétique postprandiale globale des triglycérides est alors altérée, en particulier le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale (**Figure 7**). Ceci confirme qu'il existe une compétition pour l'action de la lipoprotéine lipase entre les lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale et hépatique pour l'hydrolyse des triglycérides [26].

**Figure 7 :**  
**Mécanismes de l'athérogénicité des lipides postprandiaux**



### Légende

- 1 - augmentation de la synthèse et de la sécrétion de VLDL-TG par l'hépatocyte
- 2 - retard à l'épuration des lipoprotéines riches en triglycérides par compétition de substrats pour la lipoprotéine lipase entre les chylomicrons et les VLDL
- 3 - augmentation des échanges de triglycérides vers les HDL, et d'esters de cholestérol vers les particules riches en triglycérides sous l'action de la CETP, avec formation secondaire de LDL petites et denses
- 4 - diminution en période postprandiale de l'enrichissement par les LRT des HDL en phospholipides

## 2 - Anomalies qualitatives des lipoprotéines

### • LDL petites et denses

Les lipoprotéines LDL sont hétérogènes et différentes sous-classes ont été individualisées en fonction de leur taille et de leur densité. Deux phénotypes principaux sont ainsi décrits : un phénotype A (densité : 1,025 à 1,044 g/ml, diamètre : > 25,5 nm), représenté par des grosses particules LDL pauvres en cholestérol estérifié, et un

phénotype B (densité : 1,044 à 1,060 g/ml, diamètre : < 25,5 nm), constitué de particules LDL denses et petites, très riches en cholestérol estérifié. Dans un quart de la population, les particules LDL petites et denses sont prédominantes, une proportion plus marquée de particules LDL grosses ou intermédiaires caractérisant le reste de la population [16]. Le phénotype B de LDL est contrôlé par un gène sur le locus du chromosome 19, situé à proximité du gène du LDL-récepteur. La fréquence du phénotype B est liée à l'âge et au sexe avec une expression maximale après l'âge de 20 ans pour l'homme et après la ménopause pour la femme [167]. Ainsi, des facteurs génétiques et environnementaux influencent l'expression du phénotype B.

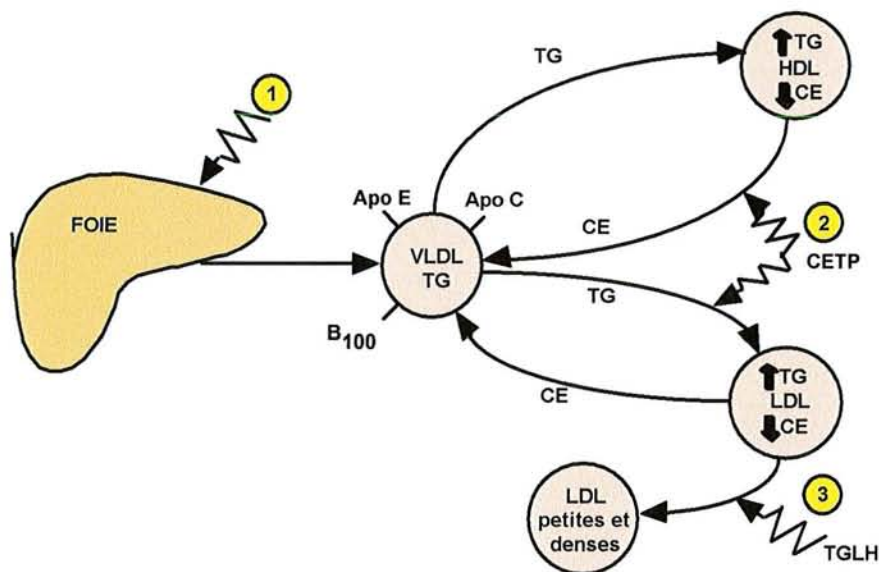
Des anomalies lipidiques sont classiquement associées au phénotype B de LDL, et en particulier l'augmentation des triglycérides, des VLDL-TG, de l'apo B, et une diminution du cholestérol-HDL et de l'apo A-I. Ces LDL denses sont moins bien reconnues par le récepteur spécifique des LDL, et par conséquent sont susceptibles d'être oxydées et de suivre la voie macrophagique non spécifique d'épuration des LDL [229]. L'ensemble de ces données renforce l'hypothèse selon laquelle le phénotype B de LDL représente une situation métabolique athérogène. Les LDL petites et denses sont associées en particulier à un risque de maladie coronarienne trois fois plus élevé comparativement aux grosses LDL [14].

Sur le plan physiopathologique, le rôle spécifique de l'insulinorésistance dans la formation des particules LDL a été évoqué, en particulier chez des sujets non diabétiques [101]. Les sujets de phénotype B présentent une glycémie, une triglycéridémie et une insulinémie plus élevées, une concentration plasmatique de cholestérol-HDL abaissée, et une tension artérielle plus élevée [184].

La concentration de triglycérides reste le meilleur paramètre explicatif de la formation des LDL petites et denses [158], dont la genèse s'effectue probablement en

période postprandiale [56]. En effet, même normolipidémiques à jeun, les diabétiques de type 2 forment plus de LDL petites et denses dès la 6ème heure postprandiale [12]. L'augmentation de production de VLDL-TG favorise l'action de la CETP, aboutissant à l'enrichissement en triglycérides des particules HDL, mais également LDL [78]. Ces LDL enrichies en triglycérides, sous l'action de la lipase hépatique, pourraient conduire selon cette hypothèse à la formation de LDL petites et denses (Figure 8).

**Figure 8 :**  
**Mécanismes physiopathologiques de formation des LDL petites et denses**



### Légende

- 1 - augmentation de la synthèse et de la sécrétion de VLDL-TG par l'hépatocyte, après levée de l'effet inhibiteur de l'insuline
- 2 - augmentation des échanges de triglycérides vers les HDL et les LDL, et d'esters de cholestérol (CE) vers les particules riches en triglycérides (VLDL) sous l'action de la CETP stimulée par l'hyperproduction de VLDL.
- 3 - augmentation de l'activité de la TGLH sur les LDL enrichies en triglycérides, avec formation secondaire de LDL petites et denses

Le niveau de la triglycéridémie au-delà duquel cette formation débiterait, se situe à des concentrations de 1,50 g/l [141]. Sur ces arguments, plusieurs auteurs défendent ainsi l'hypothèse d'une formation des LDL petites et denses en période postprandiale.

- **Composition en phospholipides (PL) des lipoprotéines**

En période postprandiale, il est classiquement rapporté une augmentation physiologique mais tardive des phospholipides totaux [178]. Cette augmentation d'environ 15 à 20 p. 100 touche principalement la fraction HDL, les autres fractions lipidiques n'étant pas affectées. Les triglycérides à jeun, mais également les lipoprotéines riches en triglycérides jouent un rôle essentiel dans l'enrichissement postprandial en phospholipides des HDL [226](**Figure 7**).

Dans des situations pathologiques comme l'obésité, le diabète de type 2 ou chez des patients coronariens, un retard et/ou une réduction de l'enrichissement en phospholipides des HDL est démontré [92,148]. Le ou les facteur(s) explicatif(s) restent à déterminer, mais la relation avec le niveau de sensibilité à l'insuline est suspecté. Les activités de transfert des lipides pourraient intervenir. Aucune différence dans l'activité de la *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP) n'ayant été observée, en particulier chez des coronariens, le rôle de la *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) devrait être évalué. La répercussion de telles anomalies qualitatives reste hypothétique, mais elles traduisent certainement un retard à l'assemblage des composants de HDL natives.

### **3 - Lipides postprandiaux et coagulation**

L'influence des lipides postprandiaux sur les phénomènes thrombotiques fait l'objet de controverses [189]. A jeun, les concentrations élevées de triglycérides favorisent l'adhésion des monocytes à la surface des cellules endothéliales, en particulier chez les patients diabétiques de type 2 [115]. Les premiers travaux retrouvaient également un état pro-thrombotique favorisé en période postprandiale : activation des facteurs VII [208] et XII, et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), stimulation de l'agrégabilité plaquettaire ou érythrocytaire *in vitro*. Ces phénomènes sont susceptibles

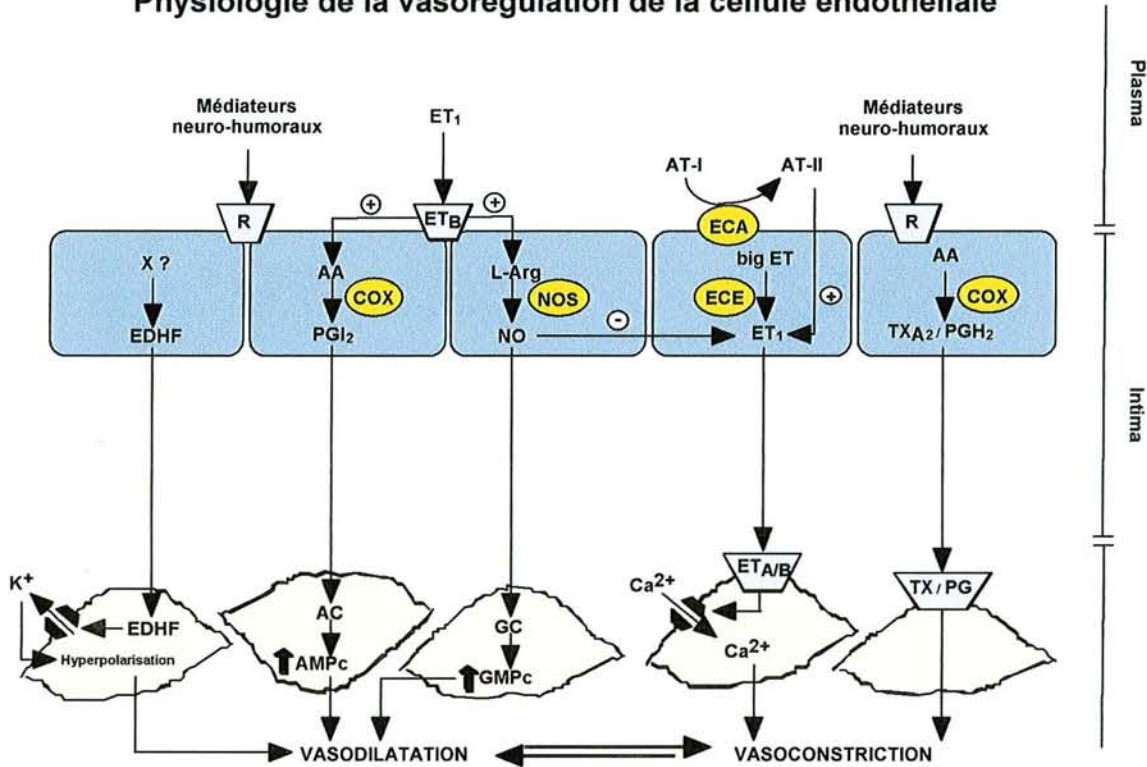
en effet de favoriser des accidents ischémiques aigus et de fragiliser la plaque d'athérome. Plus récemment, aucune modification de la viscosité plasmatique, facteur de perfusion capillaire, n'a été observée après une charge orale en lipides chez le sujet normal [227]. Des données complémentaires chez le patient coronarien seraient potentiellement intéressantes. Chez des sujets hypertriglycéridémiques, les paramètres hémostatiques demeurent stables durant la période postprandiale, mais après une charge orale de 30 g de lipides seulement [173]. Ces deux études ont porté sur des effectifs relativement faibles de patients (12 maximum). Enfin, les dernières études ne confirment pas l'activation du facteur VII sous l'effet d'une augmentation des triglycérides plasmatiques [86].

#### **4 - Altérations de la fonction endothéliale**

L'intégrité fonctionnelle de la paroi endothéliale semble tenir un rôle au moins aussi important, si ce n'est plus, que son intégrité anatomique. Le monoxyde d'azote (NO) produit par les cellules endothéliales est un acteur primordial dans la régulation du tonus vasculaire des artères musculaires. D'autres substances vasodilatatrices sont également produites par l'endothélium: les prostacyclines ( $PGI_2$ ) par la voie de la cyclo-oxygénase, et un facteur d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses (endothelium-derived hyperpolarizing factor : EDHF) qui induit une vasorelaxation de l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire des canaux potassiques. Ces substances confèrent également à l'endothélium un pouvoir anti-agrégant. Ce système de vasorelaxation est en équilibre avec des substances vasoconstrictrices également produites par l'endothélium sous l'action de divers stimuli. L'endothéline-1 est le facteur vasoconstricteur principal, mais les prostaglandines ( $PGH_2$ ) et le thromboxane A2 ( $TXA_2$ )

jouent également un rôle important indépendamment de leur action vasoconstrictrice, en conférant à l'endothélium des propriétés pro-coagulantes (**Figure 9**).

**Figure 9 :**  
**Physiologie de la vasorégulation de la cellule endothéliale**



### Légende

NO: monoxyde d'azote, NOS: NO synthase, ET<sub>1</sub>: endothéline-1, ECE: enzyme de conversion de l'endothéline, PGI<sub>2</sub>: prostacycline, COX: cyclo-oxygénase, AA : acide arachidonique, L-Arg: L-arginine, EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor, X?: inconnu, GMPc: guanosine monophosphate cyclique, AMPc: adénosine monophosphate cyclique, PGH<sub>2</sub>: prostaglandine H<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>: thromboxane A<sub>2</sub>, AT-I: angiotensine I, AT-II: angiotensine II, ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine, Ca: calcium, K: potassium, AC: adénylate cyclase, GC: guanylate cyclase.

○ enzyme, ▽ récepteur (ET: endothéline, TX: thromboxane, PG: prostaglandines)

L'atteinte de l'endothélium vasculaire est reconnue comme un facteur initial dans le

développement de l'athérosclérose [179,193]. Les altérations de la fonction

endothéliale sont liées à l'âge [250], au tabac [112], à l'hypercholestérolémie [216], et

sont observées chez les patients hypertendus [175] ou diabétiques de type 2 [142], et

les insuffisants cardiaques [65]. La présence d'une dysfonction endothéliale chez des

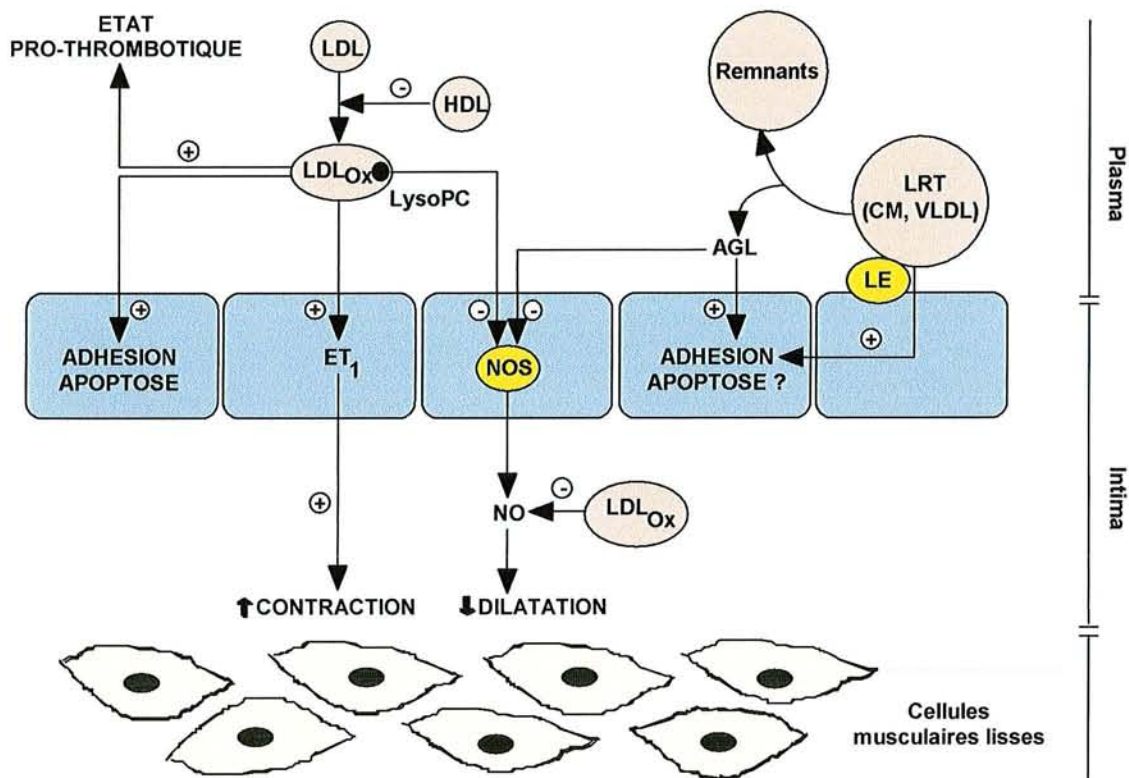
apparentés sains de sujets hypertendus [223], ainsi que chez des descendants de

coronariens, mais indemnes de tout facteur de risque vasculaire et de maladie coronaire [41], suggère une influence génétique et le caractère primitif de cette atteinte des cellules endothéliales, avant toute apparition de lésions anatomiquement décelables. Enfin, une seule étude prospective actuellement publiée a démontré le caractère pronostic des atteintes fonctionnelles de l'endothélium sur l'apparition d'événements coronaires, après un suivi de 7,7 années [207].

Les facteurs lipidiques jusqu'alors tenus pour responsables de la dysfonction endothéliale se limitaient au cholestérol-LDL et aux LDL oxydées. Le rôle des triglycérides restait à évaluer (**Figure 10**). La responsabilité directe des anomalies lipidiques postprandiales sur la fonction endothéliale est encore discutée dans des populations de patients coronariens [60,96]. Pourtant, la réponse de dilatation coronaire à l'acétylcholine *in vitro*, est altérée en présence de remnants de lipoprotéines (chylomicrons ou VLDL) [64].



**Figure 10 :**  
**Mécanismes d'action des lipides sur l'endothélium vasculaire**



### Légende

NO: monoxyde d'azote, NOS: NO synthase, ET<sub>1</sub>: endothéline-1, LDL: low density lipoprotein, LDL<sub>ox</sub>: LDL oxydé, LRT: lipoprotéine riche en triglycérides, CM: chylomicron, VLDL: very low density lipoprotein, AGL: acides gras libres, LE: lipase endothéliale, HDL: high density lipoprotein, LPC: lysophosphatidylcholine

○ enzyme

Une étude portant sur une population de 20 témoins sains normolipidiques a mesuré la vasorelaxation de l'artère brachiale (siège de l'évaluation de la fonction endothéliale) après un repas test riche en lipides (50 g). Le diamètre post-ischémique de l'artère diminue de 20 p. 100 à jeun, à 8 p. 100 à la 4ème heure postprandiale ( $p < 0,001$ ) pour revenir proche de la normale à la 6ème heure [181]. Ces variations du diamètre de l'artère sont inversement corrélées aux triglycérides postprandiaux à la 2ème heure ( $r =$

- 0,54). A niveaux caloriques équivalents, le rôle propre des triglycérides dans la dysfonction endothéliale postprandiale est confirmée, la modification de la vasorelaxation de l'artère brachiale n'étant observée qu'après ingestion d'un repas riches en lipides (50 g de lipides, 48 g de glucides), comparativement à un repas pauvre en lipides et riches en hydrates de carbone (5 g de lipides, 218 g de glucides) [172]. Chez des diabétiques de type 2, Watts *et col.* ont montré que l'élévation postprandiale des triglycérides était significativement et inversement corrélée à la réponse de vasodilatation artérielle induite par l'acétylcholine [238].

Ces altérations sont réversibles comme l'a montré Evans *et col.* chez le diabétique de type 2 après un traitement par fibrate pendant 3 mois, corrigeant les altérations lipidiques postprandiales, mais également les modifications de vasorelaxation artérielle [73].

Les lipoprotéines riches en triglycérides agissent par d'autres voies sur la cellule endothéliale pour favoriser l'athérosclérose. Des concentrations élevées de triglycérides peuvent favoriser la production de molécules d'adhésion, telles que les sélectines, ICAMs (intercellular cell adhesion molecule) et VCAMs (vascular cell adhesion molecule)[3], et par conséquent faciliter le recrutement des leucocytes et la modification de la perméabilité de l'endothélium. Les acides gras libres libérés par les lipoprotéines riches en triglycérides constituent également une piste intéressante (**Figure 10**). Steinberg *et col.* ont montré que l'augmentation du flux d'acides gras diminuait la réponse dépendante de l'endothélium au niveau des artères fémorales [218]. Le rôle cytotoxique des acides gras libres sur la cellule endothéliale passerait par un effet direct sur la NOS endothéliale [57]. La libération des acides gras au niveau de l'endothélium vasculaire dépend de l'activité d'une enzyme ubiquitaire récemment clonée, la lipase endothéliale [120]. Celle-ci possède une action phospholipasique

prédominante, alors que son action d'hydrolyse des triglycérides est inférieure à celle de la lipoprotéine lipase et de la triglycéride lipase hépatique. Cette enzyme semble jouer un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines [182].

## **VIII - Méthodes d'exploration du métabolisme lipidique postprandial**

Actuellement, l'étude de la lipémie post-prandiale n'est pas effectuée en pratique clinique courante, et ceci pour plusieurs raisons : la lourdeur de la méthodologie, tant en terme de durée de l'épreuve que de fréquence des mesures cinétiques, et l'absence de consensus sur le repas test à utiliser et sur les marqueurs postprandiaux à analyser.

### **1 - Conditions générales de réalisation**

Le repas test doit être ingéré après 12 heures de jeûne, sans consommation d'alcool depuis au moins 72 heures. Le contrôle strict de l'activité physique est nécessaire, au moins sur les 24 heures précédentes. D'une manière générale, les déviances hygiéno-diététiques grossières sont à proscrire. A l'inverse, il ne semble pas envisageable de contrôler *stricto sensu* la prise alimentaire tant quantitative que qualitative sur une période de plusieurs jours précédant le test.

### **2 - Nature et composition du repas d'épreuve lipidique**

C'est dans ce domaine que les variations les plus importantes sont observées d'une étude à une autre. Ces variations concernent la nature du repas (solide, liquide, mixte), la quantité et le type de lipides à absorber. Les repas tests utilisés pour ces explorations font parfois appel à de réelles surcharges lipidiques apportant de fortes quantités (> 100 g) de lipides par repas. Mais récemment, quelques équipes ont

considéré que ces charges étaient très excessives et non justifiées. En effet, ne correspondant à aucune réalité nutritionnelle et physiologique, elles induisent des épisodes postprandiaux durant des périodes prolongées (jusqu'à 24 h) et ne présentent de ce fait qu'une très faible capacité à révéler des anomalies fines du métabolisme postprandial.

La quantité d'apport lipidique peut varier de 30 à 150 g selon les auteurs. La réponse lipidique est linéaire en fonction de la quantité de lipides ingérés [67]. Le facteur limitant digestif est à prendre en compte, les capacités de vidange gastrique étant en moyenne de 3 cal/minute. Rapporté à une charge orale en lipides de plus de 1000 Kcalories, un délai de près de 6 heures est nécessaire à une vidange gastrique totale ! Dans ces conditions, les capacités métaboliques des sujets et/ou des patients apparaissent artificiellement débordées. La qualité des lipides (répartition en acides gras saturés, mono- et polyinsaturés) a été discutée précédemment et influence la réponse lipidique postprandiale.

La quantité de glucides à apporter reste débattue. L'influence d'une augmentation de la ration en glucides sur le métabolisme de la voie endogène des lipoprotéines riches en triglycérides a été démontrée chez le diabétique de type 2 [118]. Karpe *et col.* proposent idéalement de s'affranchir au maximum de l'effet des hydrates de carbone et donc de limiter l'influence de la sécrétion d'insuline, mais au risque de créer un repas hautement artificiel sans glucides [127]. Cette solution présente l'inconvénient de faire abstraction du rôle de l'insuline et de l'hyperinsulinisme postprandial sur le métabolisme lipidique, ce qui pourrait limiter notablement la valeur du test. La vérité se situe probablement à un niveau intermédiaire.

### **3 - Niveau calorique et quantité en lipides du repas test en fonction des paramètres anthropométriques**

Une majorité d'études apporte un repas hyperlipidique ajusté sur la surface corporelle : en moyenne 50 g de lipides par m<sup>2</sup> de surface corporelle [177], mais jusqu'à 70 g, soit pour certains patients plus de 150 g de lipides. Pour les auteurs qui n'ajustent le repas sur aucun critère anthropométrique, les quantités absolues de lipides ingérés varient de 50 à 80 g, soit un pourcentage de lipides de 50 p. 100 à 85 p. 100 du total calorique. L'absence d'ajustement a le mérite de simplifier la réalisation pratique du test, et d'éviter les fausses interprétations de résultats métaboliques, lorsque les données anthropométriques des populations étudiées diffèrent de manière caricaturale.

### **4 - Méthodologie de l'épreuve d'hyperlipémie provoquée : durée de l'épreuve, fréquence des mesures biologiques et paramètres étudiés**

Il est presque admis qu'un suivi sur 8 heures est suffisant pour une étude cohérente de l'épuration lipidique postprandiale. L'absorption de repas tests comportant des quantités de lipides plus faibles (40-50 g), favorise une épuration plus rapide, et permet ainsi de réduire la durée du test sur 6 à 7 heures. Au-dessous de cette durée, le risque est de ne pas détecter des anomalies du métabolisme lipidique postprandial survenant dans la période postprandiale tardive, anomalies dont le rôle athérogène potentiel est suspecté. Les explorations plus prolongées (au-delà de 12 heures) sont de réalisation difficile, et n'apporte en général pas d'élément explicatif supplémentaire. Dans des contextes pathologiques, le maintien d'une prise de certains traitements (anti-diabétiques oraux,  $\beta$ -bloquants, diurétiques thiazidiques) qui modifient le profil lipidique et/ou la sensibilité à l'insuline, peut fausser l'interprétation des résultats postprandiaux. Ces mêmes études, qui effectuent une analyse postprandiale prolongée, sont réalisées

à l'aide de repas test contenant une proportion élevée de lipides (jusqu'à 140 g, ou au-delà de 1500 calories !).

Les paramètres discriminants entre les populations témoins et les populations pathologiques font appel à des différences sur les aires totale ou incrémentale sous la courbe du paramètre étudié (ex: ASC ou ASCi des triglycérides plasmatiques), sur les pics lipidiques et sur les temps tardifs de la période postprandiale [177]. L'analyse des aires incrémentales de lipides postprandiaux est indispensable dès lors que les populations étudiées diffèrent sur leurs paramètres lipidiques à jeun.

Une seule étude de reproductibilité de l'épreuve lipidique postprandiale a été réalisée en 1992, chez 10 sujets sains étudiés à deux reprises dans des conditions similaires. Les concentrations de palmitate de rétinol aux temps tardifs (9ème heure) sont mieux corrélés ( $r = 0,94$ ), que ne le sont celles des triglycérides ( $r = 0,87$ )[36]. En terme de reproductibilité, les coefficients de variation interindividuelle des triglycérides sont de 35 à 36 p. 100 à 3 heures et demie et de 46 à 49 p. 100 à 9 heures.

## **5 - Marqueurs biologiques de l'épuration lipidique**

Actuellement, l'étude de la lipémie postprandiale n'est pas effectuée en pratique clinique courante. Cependant, des marqueurs prédictifs de la réponse lipidique postprandiale ont été identifiés. Les plus importants sont les concentrations plasmatiques de triglycérides et de cholestérol-HDL à jeun, et plus spécifiquement celui de HDL2, ainsi que l'activité des enzymes lipasiques et leur polymorphisme génétique. Des paramètres évolutifs sont utilisés pour apprécier la qualité de l'épuration lipidique postprandiale, en particulier les triglycérides, le palmitate de rétinol et plus récemment l'apoprotéine B48.

En raison des échanges et des transferts lipidiques existant entre les différentes lipoprotéines d'origine exogène et endogène, la simple mesure des triglycérides peut apparaître insuffisante sur le plan de l'analyse mécanistique des phénomènes lipidiques postprandiaux. Les esters de vitamine A, dont on mesure généralement l'ester palmitique ou palmitate de rétinol (RP), sont un marqueur vitaminique des lipoprotéines d'origine intestinale. L'organisme humain est incapable de synthétiser du rétinol et le foie qui le stocke, ne libère pas d'esters de rétinol dans la circulation, mais seulement du rétinol transporté par la *Retinol Binding Protein* (RBP). Ainsi, les esters de la vitamine A ne sont pas dilués dans un pool d'esters endogènes comme le sont les triglycérides. Pour cette raison, le palmitate de rétinol représente un marqueur assez spécifique des lipoprotéines d'origine intestinale, essentiellement les chylomicrons et leurs remnants qui transportent ce palmitate de rétinol après son absorption [19].

Si l'intérêt du dosage des esters de rétinol et en particulier du palmitate de rétinol en chromatographie liquide haute performance (CLHP) est reconnu, il persiste néanmoins un certain nombre d'incertitudes ou d'écueils.

- Comme pour la quantité de lipides, celle de vitamine A administrée dans le même temps que le repas test varie selon les études entre 27.000. à 300.000 UI par charge lipidique, car elle est souvent proportionnelle à la surface corporelle du sujet.
- La variabilité inter-individuelle du dosage du palmitate de rétinol en CLHP reste élevée et supérieure à celle des triglycérides.
- La spécificité du palmitate de rétinol comme marqueur des protéines d'origine digestive est discutée, certains auteurs ayant décrit des concentrations de palmitate de rétinol dans les particules riches en triglycérides et contenant de l'apo B100. Cela suggérerait un transfert de palmitate de rétinol entre les lipoprotéines plasmatiques [129]. Le palmitate de rétinol ne serait donc pas fidèlement synonyme de la présence

de remnants de chylomicrons (CM). Cependant, ce transfert n'est significatif qu'après la 8ème heure postprandiale [46,129], et d'autres auteurs considèrent ce transfert comme quantité négligeable, quelle que soit la période postprandiale [23,145,245].

- Enfin, des précautions sont à prendre compte tenu des quantités de vitamine A administrées, en particulier chez la femme en âge de procréation (test de grossesse à pratiquer).

L'apo B48, spécifique des chylomicrons d'origine intestinale chez l'Homme, s'accumule de façon anormale dans le sérum chez les sujets présentant des défauts d'épuration postprandiale des lipoprotéines riches en triglycérides [132,159]. Selon des travaux récents, son dosage sur des échantillons à jeun présente un grand intérêt prédictif de la réponse postprandiale [213]. La technique classique utilisée en recherche (séparation des lipoprotéines riches en triglycérides par ultracentrifugation puis séparation et quantification des protéines par SDS-PAGE) est beaucoup trop lourde pour être utilisée en routine. Des méthodes d'immuno-affinité permettent, après séparation des particules à apo B100 et à apo B48, de doser les triglycérides associés, mais ces méthodes de recherche n'ont pas été transposées (kits) pour une utilisation en routine. Quelques laboratoires ont développé récemment une méthode ELISA qui permet une quantification fiable de l'apo B48 sur sérum ou plasma normolipémique, mais dont la fiabilité n'est pas encore complètement démontrée pour la totalité des échantillons hyperlipémiques. Enfin, l'anticorps spécifique n'est pas commercialisé.

D'autres méthodes font appel à la séparation par immuno-affinité des résidus de lipoprotéines riches en triglycérides contenant de l'apo B et de l'apo E. Cette technique pourrait être utilisée en routine lorsque les études de validations seront conduites à leur terme. L'apo C-III, un inhibiteur de la lipoprotéine lipase, présente des concentrations à jeun élevées chez les patients montrant un défaut d'épuration des lipoprotéines riches



en triglycérides [159]. Son dosage sur des prélèvements à jeun pourrait avoir une valeur prédictive qui reste à valider pour l'ensemble des groupes de patients concernés. Une méthode immuno-électrophorétique est déjà commercialisée (Sebia) permettant de quantifier l'apo C-III dans les sérums.

Ainsi, la relative lourdeur expérimentale de l'épreuve pousse à rechercher des alternatives à cette stratégie. Cela consisterait à définir des marqueurs mesurables à jeun et/ou en période postprandiale qui seraient représentatifs ou associés au métabolisme postprandial.

## **IX - Traitements pharmacologiques des altérations de l'épuration lipidique postprandiale**

Les études d'intervention thérapeutique restent encore peu nombreuses et portent principalement sur les fibrates et les biguanides. Les effets hypotriglycéridémiants des fibrates sont observés également sur les cinétiques post-prandiales des triglycérides [222]. Cependant, cet effet peut être secondaire à la réduction des triglycérides à jeun, à l'augmentation du cholestérol-HDL et à l'augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase à l'état basal.

Les effets des drogues hypolipémiantes sur les paramètres lipidiques postprandiaux ont été largement décrits chez des sujets hyperlipidémiques et/ou présentant une coronaropathie [210,240]. Les fibrates (fénofibrate, bézafibrate, gemfibrozil) sont efficaces sur la réduction des triglycérides à jeun, et par conséquent agissent également sur l'amplitude de la réponse lipidique postprandiale à un niveau bien plus marqué que celui des statines [45]. Rares sont les essais comparatifs entre des molécules à mode d'action différent [236]. Des données préliminaires

d'amélioration de l'épuration lipidique sous atorvastatine sont décrites chez l'animal [37]

**(Tableau 2).**

Les études d'intervention thérapeutique chez les diabétiques de type 2 restent peu nombreuses et portent essentiellement sur les fibrates et les biguanides [13,222]. Cependant, cet effet peut aussi être secondaire à la réduction des triglycérides à jeun, ou à l'augmentation du cholestérol-HDL. Ces études encore ponctuelles portent sur un nombre limité de patients et un temps de traitement de quelques semaines. Elles méritent donc d'être confirmées sur des séries plus larges et ne permettent pas d'affirmer la supériorité d'un fibrate par rapport à un autre. Sous metformine, une amélioration de l'insulinosensibilité est observée, associée à une réduction de l'amplitude d'élévation postprandiale des triglycérides, des acides gras libres et du palmitate de rétinol [124]. A jeun, l'efficacité de la metformine se traduit déjà par une réduction des triglycérides totaux, des VLDL-TG et LDL-TG.

**Tableau 2** : Principales études d'intervention thérapeutique sur les altérations du métabolisme lipidique postprandial

Référence	Posologie (durée de l'essai)	Groupes étudiés (n)	Durée du test (h)	Effets sur les paramètres postprandiaux
[240]	Gemfibrozil 1200 mg (6 semaines)	7 HLP type IV	24	↓ RP (CM) 60% ↓ ASC RP (CM 71%, nCM 31%)
[240]	Cholestyramine 24 g/jour (6 semaines)	5 HLP type IIa	24	↑ RP (CM) 89% ↑ ASC RP (CM) 86%
[210]	Fénofibrate 300 mg (8 semaines)	24 coronariens	8	↓ ASC TG 46% ↑ LPL 37%
[39]	Simvastatine 10-40 mg/jour	7 HLP type IIb	24	↓ ASC RP (nCM) 15%
[222]	Gemfibrozil 600 mg x 2 (12 semaines)	20 diabétiques type 2	24	↓ ASC TG (plasma, CM, VLDL) ↓ ASC RP (plasma, CM, VLDL)
[124]	Metformine (+ sulfamides) 850 mg x 3	16 diabétiques type 2	16	↓ ASC glyc, AGL, insulinémie ↓ ASC TG (plasma, CM, nCM) ↓ ASC RP (plasma, CM, nCM)
[4]	Huiles de poisson 1,33 g EPA, 0,95 g DHA (15 semaines)	55 sujets témoins	8	↓ ASC TG (plasma, CM)
[94]	Metformine 850 mg x 2 (3 mois)	9 ITG	8	↓ ASC RP (plasma 50%, CM 56%, nCM 32%)
[13]	Bézaafibrate 400 mg (5 semaines)	10 diabétiques type 2	8	↓ ASC TG (CM 54%, nCM 39%) ↓ ASC RP (CM) 53% ↓ ASC AGL 35%
[37]	Atorvastatine 3 mg/kg/jour (28 jours)	6 porcs traités / 6 porcs non traités	12	↓ pic LRT 29%, ↓ ASC LRT 24% ↑ clairance LRT (x1,4)
[236]	Gemfibrozil 600 mg (G) vs Simvastatine 20 mg (S) (2 mois)	30 HLP type IIb	8	(G) ↓ ASC TG 34% (S) ↓ ASC TG (10%, NS)

**Légende** : LRT : lipoprotéines riches en TG; HLP : hyperlipoprotéinémie; ITG : intolérant au glucose ; RP : palmitate de rétinol; ASC : aire sous la courbe; CM : chylomicron; nCM : non chylomicron; VLDL : very-low density lipoprotein; LDL : low density lipoprotein; HDL : high density lipoprotein; AGL : acides gras libres; Glyc : glycémie; LPL : lipoprotéine lipase; EPA : acide eicosapentanoïque; DHA : acide docosahexanoïque.

Résultats donnés avec un seuil de significativité à  $p < 0,05$  (NS : non significatif).

Chez des obèses intolérants au glucose, l'utilisation de trois mois d'un traitement par biguanides s'accompagne également d'une amélioration de la cinétique postprandiale du palmitate de rétinol (ASCs plasma, CM et nCM). De manière assez surprenante, aucune amélioration n'est rapportée sur la cinétique des triglycérides [94].

Finalement, les molécules efficaces sur les lipides postprandiaux améliorent avant tout les paramètres lipidiques à jeun connus pour être prédictifs de la réponse métabolique postprandiale. A ce jour, il n'est pas démontré d'efficacité de ces drogues hypolipémiantes et/ou sensibilisatrices de l'insuline sur la qualité de l'épuration lipidique indépendamment d'amélioration lipidique à jeun. Les thiazolidinediones qui améliorent la sensibilité à l'insuline des patients par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  ont un avenir prometteur dans ce domaine. En corrigeant les anomalies de la lipolyse adipocytaire, elles peuvent contribuer à un meilleur contrôle du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides en période postprandiale.

## **Deuxième Partie : Travaux de recherche**

## I - Objectifs

Les travaux que nous avons réalisés, ainsi que ceux actuellement en cours, ont deux objectifs principaux :

- Démontrer l'importance des altérations du métabolisme lipidique postprandial en pathologie humaine, en s'appliquant à mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques en jeu. Cette démarche repose sur l'étude de populations à risque cardiovasculaire ou atteintes de pathologie vasculaire, comparées à des populations témoins. Ces populations ont été recrutées sur des critères stricts tant sur le plan clinique que biologique, afin d'éviter les biais méthodologiques et de permettre une analyse précise des résultats observés.
- Proposer des adaptations cliniques et méthodologiques afin de simplifier l'analyse du métabolisme lipidique postprandial, et de standardiser les conditions d'exploration. En effet, peu d'équipes sont susceptibles d'appliquer ces modèles dynamiques d'analyse du métabolisme lipidique postprandial, du fait de la complexité et de la lourdeur méthodologique qu'ils représentent pour le patient, mais aussi pour le personnel médical et paramédical. En outre, ces analyses lipidiques ont un coût important qui dépend directement du nombre de prélèvements sanguins effectués au cours de la période postprandiale. L'évolution vers une simplification et une standardisation peut sembler illusoire. Elle conditionne cependant le développement à terme du concept postprandial de l'athérosclérose sur la base d'études d'observation et/ou d'intervention.

## II - Patients et sujets témoins

Le recrutement des témoins et des patients a été effectué sur la base de critères d'inclusion et d'exclusion cliniques et biologiques particulièrement stricts. Ceci constitue un élément déterminant dans l'interprétation des résultats de nos travaux, sachant que des études antérieures ont clairement démontré que des anomalies cliniques et/ou lipidiques à jeun étaient associées à une amplitude plus marquée de la réponse lipidique postprandiale [171,176,178]. Par conséquent, l'évaluation de la lipémie postprandiale pourrait être informative chez des sujets dont le profil lipidique à jeun ne constitue pas en soi un marqueur de risque vasculaire.

- Les sujets témoins, de sexe masculin ou féminin, étaient de poids normal sans anomalie de la tolérance glucosée, normolipidiques, normotendus (pression artérielle systolique/diastolique < 140/90 mm Hg), indemnes de pathologie métabolique, endocrinienne, rénale, hépatique, ou cardiovasculaire, non fumeurs, et ne prenaient aucune thérapeutique (traitement hormonal, corticoïdes, diurétiques thiazidiques, antiinflammatoires non stéroïdiens) susceptible d'interférer sur les paramètres lipidiques à jeun et postprandiaux.
- Les sujets obèses étaient également normolipidémiques, normotolérants au glucose et non diabétiques. Ils répondaient aux mêmes autres critères d'inclusion et d'exclusion que les témoins sains.
- Le bilan lipidique à jeun de tous les sujets répondait aux critères suivants :
  - triglycérides < 1,50 g/l
  - cholestérol-LDL < à 1,60 g/l
  - cholestérol-HDL > à 0,35 g/l pour les hommes  
> 0,40 g/l pour les femmes

avec comme objectifs de répondre aux deux questions suivantes :

1) Etudier l'influence d'un processus pathologique sur la lipémie postprandiale 'per se', en l'absence d'anomalie lipidique à jeun.

2) Démontrer l'existence d'altérations lipidiques postprandiales dans des populations pathologiques dont le bilan lipidique à jeun ne constitue pas en soi une indication de prise en charge diététique et/ou médicamenteuse, selon des critères de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) [1] ou du *National Cholesterol Education Program* (NCEP)[95].

Les patients et les témoins recrutés pour ces études, toutes sans bénéfice individuel direct, répondaient aux règles de la loi Huriet. Après avoir eu connaissance des objectifs et du déroulement du protocole (notice d'information destinée au témoin et au patient), le consentement éclairé et signé de chacun des participants a été recueilli.

Des témoins ont été recrutés à partir des listes de volontaires sains du Centre d'Investigation Clinique-INSERM du Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy. Ces différents protocoles ont obtenu un avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) de Lorraine.

### **III - Epreuve dynamique d'hyperlipémie provoquée (test de charge orale en lipides)**

#### **1 - Mise au point du repas lipidique test**

Le repas lipidique test que nous avons développé devait répondre à plusieurs critères :

- Bénéficier d'une tolérance digestive satisfaisante



- Provoquer une réponse lipidique postprandiale significative (doublement des concentrations de triglycérides plasmatiques)
- Etre reproductible et simple à l'élaboration
- Avoir une consistance de type émulsion
- Etre stable pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines.

Ces différents critères ont justifié des adaptations d'ordre quantitatif et qualitatif pour l'élaboration finale du repas lipidique test. Initialement préparé par les Laboratoires Pierre Fabre Santé (Castres, France), les premiers essais physiologiques et organoleptiques avec ce repas riche en lipides ont été réalisés au cours de l'année 1994 (date d'obtention du PHRC). Les résultats cliniques et métaboliques qui ont amené aux modifications de composition nutritionnelle de ce repas lipidique test sont rapportés dans le **Tableau 3**. Au total, 129 épreuves de charge orale en lipides ont été réalisées, chez 106 sujets ou patients inclus définitivement, permettant la mise au point de la charge orale en lipides et la réalisation des études cliniques correspondant au 3 premiers articles. Un seul sujet a présenté des vomissements 8 heures après le repas test, et un patient a refusé d'ingérer le repas test du fait d'une aversion importante pour le chocolat.

Le développement d'une forme de longue conservation type UHT a été envisagée auprès de firmes industrielles (société ACTINI), mais à ce jour cette partie du projet n'a pas pu aboutir. Nous avons déposé une enveloppe Soleau décrivant la composition du repas test et les résultats préliminaires qui s'y rapportent, afin de protéger le développement industriel potentiel de ce repas lipidique test (**annexe 1, page 177**).

**Tableau 3** : Evolution dans l'élaboration et la composition du repas lipidique test

Date	Février 94-Juin 95	Septembre 95-Novembre 95	Novembre 95-Décembre 95	Février 96-Juin 97	Mai 97-Juillet 97
Composition nutritionnelle	huile de palme 82 g dynasan 25 g dynasan 10 g cacao dégraissé 8 g gélatine DSF 13 g sucre glace 13 g amidon de maïs 13 g acide sorbique 0,8 g eau purifiée 15,2 g	huile de palme (40 ou 80 g) dynasan dynasan cacao dégraissé gélatine DSF sucre glace amidon de maïs acide sorbique eau purifiée	lait écrémé en poudre beurre huile d'arachide chocolat eau gélatine acide sorbique sorbate de potassium conservateurs, édulcorants	lait écrémé en poudre beurre huile d'arachide chocolat eau gélatine acide sorbique sorbate de potassium conservateur, édulcorant	même formulation plus liquide future préparation UHT
Numéro de lot	formule 53/1 à 53/4	formule 76 à 95	formule 98 à 107	formule 108/1 à 108/4	formule 135/2 à 153 et 183
Poids (g)	180 g	135 à 220 g	50 à 135 g (effet-dose)	180 g	180 g
Sujets testés (n)	21 (13 H, 8F)	Formule non testées en clinique	8 témoins	65 sujets (34 H, 31 F) début des études cliniques	12 témoins (6 H, 6F)
Réponse lipidique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 55% répondeurs TG</li> <li>• 51% répondeurs RP</li> <li>• hétérogénéité des résultats</li> </ul>	réponse physiologique médiocre	réponse satisfaisante	réponse satisfaisante <ul style="list-style-type: none"> <li>• pic de TG à 4 heures</li> <li>• doublement des TG</li> <li>• retour au taux initial à 8 h</li> </ul>	réponse satisfaisante
Tolérance digestive	mauvaise <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5% effets secondaires</li> </ul>	mauvaise <ul style="list-style-type: none"> <li>• abandon de l'huile de palme</li> </ul>	bonne	bonne tolérance	bonne tolérance clinique
Appréciation organoleptique	mauvaise	mauvaise	acceptable	acceptable	acceptable
Microbiologie	Négative <ul style="list-style-type: none"> <li>• levures et moisissures</li> <li>• escherichia coli</li> <li>• salmonelles</li> <li>• staphylococcus aureus</li> <li>• entérobactéries et gram-</li> </ul>	Négative <ul style="list-style-type: none"> <li>• levures et moisissures</li> <li>• escherichia coli</li> <li>• salmonelles</li> <li>• staphylococcus aureus</li> <li>• entérobactéries et gram-</li> </ul>	Négative <ul style="list-style-type: none"> <li>• levures et moisissures</li> <li>• escherichia coli</li> <li>• salmonelles</li> <li>• staphylococcus aureus</li> <li>• entérobactéries et gram-</li> </ul>	Négative <ul style="list-style-type: none"> <li>• levures et moisissures</li> <li>• escherichia coli</li> <li>• salmonelles</li> <li>• staphylococcus aureus</li> <li>• entérobactéries et gram-</li> </ul>	négative <ul style="list-style-type: none"> <li>• levures et moisissures</li> <li>• escherichia coli</li> <li>• salmonelles</li> <li>• staphylococcus aureus</li> <li>• entérobactéries et gram-</li> </ul>

La longueur de la chaîne des acides gras détermine les processus de digestion et d'absorption. On sépare les acides gras en 4 catégories : les acides gras à chaînes courtes qui comportent 4 à 6 atomes de carbone, les acides gras à chaînes moyennes qui comportent de 8 à 12 atomes de carbone et qui sont rapidement oxydés pour jouer un rôle essentiellement énergétique, les acides gras à chaînes longues de 14 à 18 atomes de carbone et enfin ceux à chaînes très longues qui comportent 20 ou plus atomes de carbone. Les acides gras à chaînes courtes (< à C12) sont rapidement hydrolysés et leur absorption peut se faire directement par l'entérocyte. Dans ces conditions, ils traversent la cellule intestinale par diffusion sans activation ni estérification. Ils ne participent donc pas à la formation des chylomicrons. Ils sont transportés directement par voie porte sous forme d'acides gras libres fixés sur l'albumine et non pas par voie lymphatique.

Notre préparation lipidique contient ainsi une quantité prédominante d'acides gras à longues ou très longues chaînes afin de promouvoir la formation de chylomicrons lors de la phase digestive intestinale [28]. Nous avons également testé la granulométrie de cette préparation lipidique, montrant que 100% des particules avaient un diamètre inférieur à 40  $\mu\text{m}$ , et parmi celles-ci, 80% avaient un diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$ . Cette dernière valeur est importante car la taille des particules lipidiques conditionne en grande partie leur absorption intestinale et par conséquent la formation de chylomicrons par les canaux chylifères [33]. Entre deux émulsions de taille variable (1 et 10 microns), l'émulsion la plus fine facilite l'absorption du repas test. Enfin, le maintien d'une palatabilité du repas test a été prise en compte, et justifie également les choix nutritionnels et physico-chimiques d'une émulsion.

Actuellement, la fabrication de la charge en lipides est extemporanée, sur la base de la formule 183 des Laboratoires Pierre Fabre (**Tableau 3**). Le repas

lipidique test est une émulsion semi-liquide, et est composé de produits alimentaires primaires (**Tableau 4**). Cette émulsion de 180 ml est composée de 6 g de lait écrémé en poudre, 33 g de beurre, 43 g d'huile d'arachide, 40 g de chocolat noir, 80 ml d'eau et de quantité négligeables de gélatine (une demi feuille de gélatine). Le total calorique est d'environ 850 Kcalories composé de 85% de lipides, 13% de glucides (dont 24 g de saccharose, et 4 g de lactose) et 2% de protides. Sur les 80 g de lipides, 35 g sont des acides gras saturés, 30 g des acides gras monoinsaturés et 15 g des acides gras poly-insaturés. Par ailleurs, le total de cholestérol alimentaire inclus dans cette préparation lipidique est de 88 mg, donc inférieur aux taux susceptibles d'influencer la réponse lipidique postprandiale. Les protéines sont principalement constituées de caséine pour 75% d'entre elles, le reste de la composition regroupant des protéines de type albumine et globuline, provenant du lait écrémé et du chocolat.

**Tableau 4** : Composition du repas lipidique test actuel

Type de nutriments (en grammes)	Répartition calorique (glucides, lipides, protides)	Composition en acides gras	
beurre 33 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>85% lipides (80 g)</b></li> <li>AGS 35 g</li> <li>AGMI 30 g</li> <li>AGPI 15 g</li> <li>cholestérol 88 mg</li> </ul>	acide caprylique C8:0	0,2%
chocolat noir 40 g		acide caprique C10:0	0,2%
huile d'arachide 43 g		acide laurique C12:0	0,3%
lait écrémé 6 g		acide myristique C14:0	1,1%
gélatine 1/2 feuille	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>13% glucides (28 g)</b></li> <li>saccharose 24 g</li> <li>lactose 4 g</li> </ul>	acide palmitique C16:0	30,4%
eau 80 ml		acide stéarique C18:0	3,4%
		acide oléique C18:1	49,3%
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>2% protéines (5 g)</b></li> <li>caséine 75%</li> <li>albumine 25%</li> </ul>	acide linoléique C18:2	13,6%
		acide arachidique C20:0	0,5%

AGS : acides gras saturés

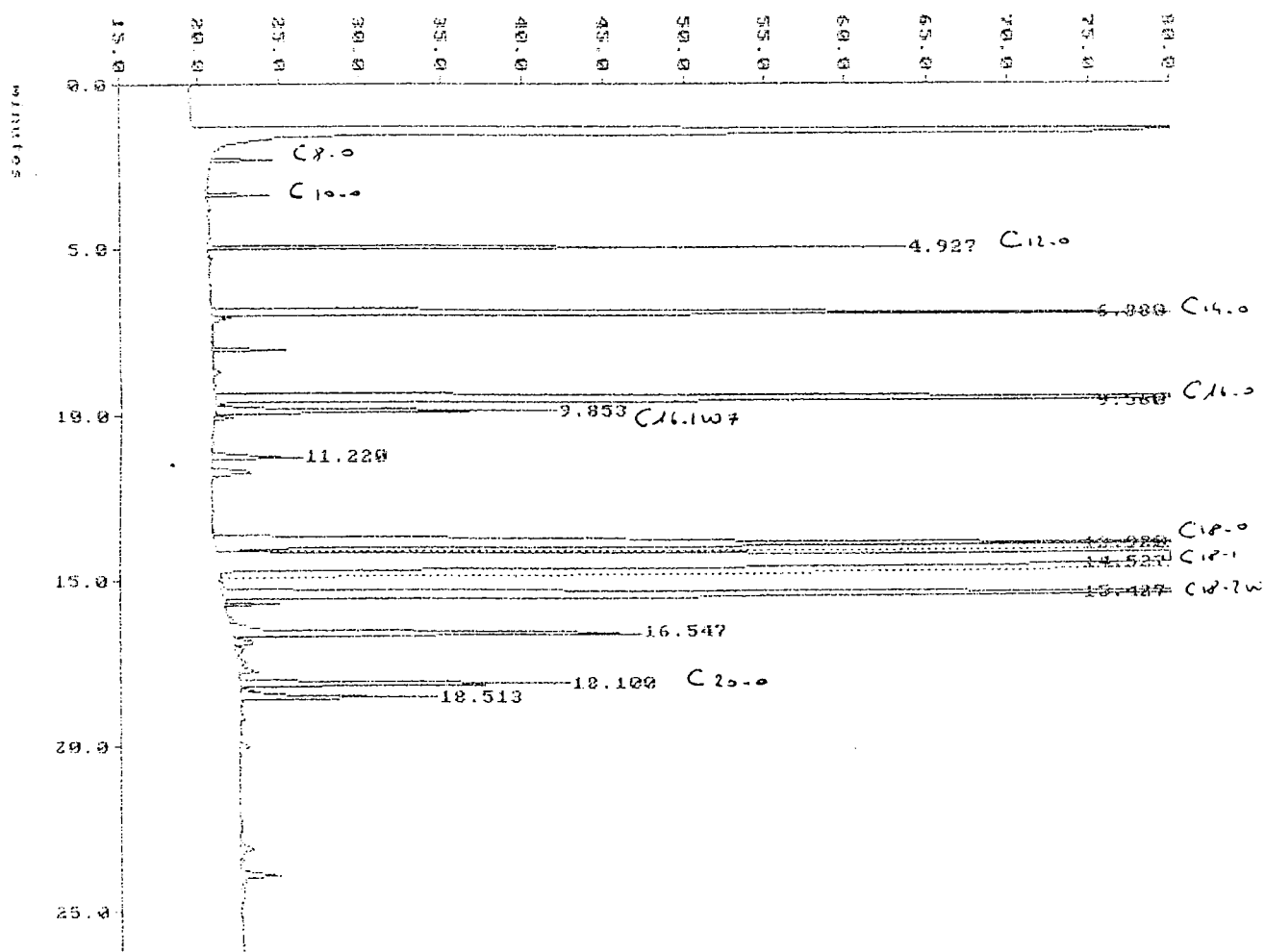
AGMI : acides gras monoinsaturés

AGPI : acides gras polyinsaturés

Le contrôle en chromatographie en phase gazeuse de la composition en acides gras a été réalisée avec l'aide des Laboratoires Pierre Fabre Santé (Castres, France)(Tableau 4, Figure 11). Le profil des acides gras est exprimé en pourcentage d'esters méthyliques totaux.

Figure 11 :

Contrôle en chromatographie en phase gazeuse de la composition en acides gras du repas lipidique test



## 2 - Ajustement des quantités de nutriments sur les paramètres cliniques

La majorité des études ajuste le repas lipidique test sur des données anthropométriques, que ce soit le poids, l'indice de masse corporelle, l'unité de kilo de poids ou le mètre carré de surface corporelle ( $m^2$  s.c.). A l'inverse, d'autres auteurs privilégient l'ingestion d'un repas lipidique test sans ajustement sur un des paramètres sus-cités. Les quantités de lipides varient alors de 50 g [159] à 65 g [32], ou sont exprimées en pourcentage de lipides par rapport à la ration calorique totale, soit 50 p. 100 [206] à 72 p. 100 [13] de lipides. Le seul argument pour une adaptation du repas test aux données anthropométriques des sujets est celui d'ajuster la quantité de lipides et/ou de calories en fonction du volume de distribution plasmatique.

Les études qui utilisent un ajustement de la charge en lipides selon des données anthropométriques (surface corporelle (s.c.) ou indice de masse corporelle), favorisent l'apparition de différences entre les populations étudiées, certaines populations obèses par exemple, pouvant ingérer jusqu'à deux fois plus de lipides que la population de référence [122]. Cet élément nous est apparu tout à fait critiquable et nous a amené à ne pas ajuster la quantité de lipides sur des paramètres anthropométriques. Bien qu'élevée en pourcentage de lipides (85%), et en se basant sur le calcul des surfaces corporelles de nos sujets, la quantité de lipides en valeur absolue donnée aux sujets de nos études varie de 35 à 49 g de lipides selon leur surface corporelle, hommes et femmes confondus, obèses et témoins confondus. Ces chiffres se situent en dessous de la quantité moyenne de 50 g de lipides par  $m^2$  s.c., classiquement rapportée dans les études [131,241]. Notre préparation nutritionnelle reste à notre sens acceptable en ce qui concerne les quantités absolues de lipides ingérés.

### 3 - Utilisation de la vitamine A

Les esters de vitamine A, dont on mesure principalement l'ester palmitique ou palmitate de rétinol, sont des marqueurs vitaminiques de l'absorption lipidique au niveau intestinal. Nous avons ainsi associé au repas lipidique test, une prise de vitamine A sous forme de gélules d'AVIBON, à la concentration de 100.000 unités, soit 2 gélules d'AVIBON. Plusieurs raisons nous ont conduit à ne pas incorporer cette vitamine A à la charge lipidique :

- Maintenir une souplesse dans l'élaboration future du repas lipidique test
- Eviter de figer définitivement les doses de vitamine A en fonction d'une quantité donnée de lipides ingérés
- Pouvoir effectuer des épreuves de charge orale en lipides à des sous-groupes de patients allergiques à la vitamine A
- Remplacer à terme l'usage de la vitamine A et de ses esters comme marqueur spécifique de l'absorption des lipoprotéines intestinales, au profit de mesure immunologique directe d'apo B48 par exemple
- Enfin, la stabilité de la vitamine A dans une mixture lipidique est mal connue et incertaine.

## IV - Techniques biologiques

### 1 - Séparation des lipoprotéines

La mesure des lipides postprandiaux fait appel à des mesures de séparation des différentes lipoprotéines plasmatiques, en particulier à l'ultracentrifugation séquentielle.

- **Séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation séquentielle**

A tous les temps du protocole postprandial, les tubes sont prélevés et laissés à température ambiante 30 minutes avant centrifugation. La centrifugation est de 15 minutes, à 4°C et à 3000 tours/minute. Après aliquotage et addition d'un inhibiteur de protéases (CALBIOCHEM<sup>®</sup>, protease inhibitor Cocktail Set I) contenant de l'AEBSF (500 µM), de l'aprotinine (1 µg/ml), de l'E-64 (1 µM), de l'EDTA (500 µM) et de la leupeptine (1 µM), les échantillons sont adressés au Laboratoire de Biochimie des lipides de l'Hôpital Broussais à Paris.

La procédure utilisée pour l'ensemble des 4 articles est la suivante, à quelques détails près. Elle consiste à effectuer une séparation des fractions lipidiques contenant des chylomicrons (CM) de celle ne contenant pas de chylomicrons (nCM) par une méthode d'ultracentrifugation. Les tubes de sang sont déposés dans un rotor de type SW41 en parapluie dans une ultracentrifugeuse de type Beckman<sup>®</sup> XL-90. L'ultracentrifugation dure 30 minutes à 4°C à 25000 tours/minute. A l'issue de cette ultracentrifugation, le surnageant d'aspect blanc laiteux est récupéré à l'aide d'une micropipette, et correspond à la fraction chylomicron. La fraction sous-jacente correspond à la fraction dépourvue de chylomicrons et est nommée fraction non-chylomicron. Elle contient notamment les remnants de chylomicrons, les VLDL et remnants de VLDL. Un dosage des triglycérides est effectué dans le plasma et dans chacune de ces sous-fractions lipidiques. Le coefficient de récupération des triglycérides est de  $98 \pm 3\%$ . Les échantillons sont par la suite congelés à -80°C pour un dosage ultérieur, automatisé et regroupé du palmitate de rétinol selon une méthode par chromatographie liquide haute performance (CLHP).



## 2 - Paramètres lipidiques

- **Triglycérides et cholestérol total**

Ils sont dosés par des méthodes enzymatiques (réactif PAP 1000, PAP 1200) colorimétrique sur automate Olympus® AU400 [6,76].

- **Cholestérol-HDL**

Il est mesuré par une méthode dite directe utilisant le principe suivant : les lipoprotéines LDL et VLDL absorbent les polyanions synthétiques présents dans le premier réactif, transformant ainsi les lipoprotéines en une forme stable. Les particules HDL libres sont solubilisées par le détergent du second réactif, ce qui permet au cholestérol de la fraction HDL d'être dosé par voie enzymatique classique en présence de cholestérol oxydase et de cholestérol estérase sur automate Olympus® AU400 (réactifs BIOMERIEUX®)[106].

- **Cholestérol HDL2 et HDL3**

La séparation des deux sous-fractions principales de HDL (HDL2 et HDL3) est réalisée par électrophorèse du sérum en gel de polyacrylamide en gradient discontinu [11].

- **Cholestérol-LDL**

Le cholestérol-LDL est calculé selon la méthode de Friedewald [82]:

$LDL-C = CT - (HDL + TG/2,2)$  si les triglycérides sont exprimés en mmol/l

(et si triglycéridémie < 5 mmol/l)

- **Apoprotéines et lipoprotéine (a)**

Ces dosages sont effectués par immunonéphélométrie. Le principe est de mesurer l'intensité de la lumière diffusée par des particules en suspension dans une cuve à circulation lorsqu'elles sont soumises à un rayon irradiant. Ces particules résultent d'une réaction d'immunoprécipitation entre l'antigène et son anticorps spécifique.

L'analyseur de type BECKMAN® Array 360 system mesure la variation d'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps.

### **3 - Palmitate de rétinol**

Ce paramètre vitaminique constitue une des clés de voûte de nos travaux de recherche. Son dosage est réalisé dans le plasma et dans les sous-fractions lipidiques chylomicron et non-chylomicron. Ce dosage fait appel à une technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP). Elle nécessite une extraction préalable et utilise un étalon interne, l'acétate de tocophérol [61]. Celui-ci, en solution dans de l'éthanol-BHT (hydroxytoluène butylé) est ajouté à 200 µl de plasma et aux fractions CM et nCM (T0 à T8). L'extraction est réalisée par addition d'hexane. Après agitation pendant 1 minute et centrifugation pendant 15 minutes à 4°C et à 35000 tours/minute, la phase supérieure (hexane) est recueillie puis évaporée sous azote à température ambiante. Les extraits secs sont ensuite conservés à -80°C. Le jour de la mesure, les résidus secs sont repris par 100 µl de méthanol et 50 µl sont injectés à la seringue dans une colonne en silice (LiChroCart® 125-4-LiChropher® 100 Merck® 125x4 mm) équipée d'une précolonne (LiChroCart® 4-4 Merck®). La phase mobile est composée de 750 ml d'acétonitrile (Merck®), 150 ml de dichlorométhane (Prolabo®) et 100 ml de méthanol (Carlo Erba®). Le débit est de 1,3 ml/min., avec une pression d'environ 0,5 à 0,6 kPSI et une température de 20°C (pompe Beckman® modèle 126). La détection est réalisée par un spectrophotomètre à barette de diode (Beckman® modèle 128) couplé à une station Gold (Beckman®, version 8.10). Les résultats sont exprimés en g/l et le seuil de détection est de 0,010 mg/l.

#### 4 - Autres mesures biochimiques

- **Glycémie plasmatique**

Le dosage de la glycémie veineuse est effectué par une méthode enzymatique et colorimétrique (kit BioMérieux®, PAP 250).

- **Leptine plasmatique**

Les concentrations de leptine plasmatique sont mesurées par une méthode radioimmunologique en triplicate (Kit LINCO research, Inc. St Louis, MO, USA). Les coefficients de variation intra- et inter-essai sont respectivement de 4,5 et 8%.

- **Insulinémie plasmatique**

La mesure de l'insulinémie plasmatique est déterminée à jeun en combinaison avec la glycémie plasmatique afin de déterminer la valeur du HOMA, mais également au cours des hyperglycémies provoquées par voie orale, et au cours des analyses cinétiques postprandiales. Le dosage est radioimmunologique (Insulin IMX, Laboratoires Abbott, Tokyo, Japon). Le degré de croisement avec la pro-insuline est inférieur à 0,05%.

- **Génotype d'apo E**

Le génotypage de l'apo E est réalisé par une méthode des enzymes de restriction [42,114].

#### 5 - Mesure de la sensibilité à l'insuline (rappel)

La sensibilité à l'insuline joue un rôle déterminant dans la genèse ou l'aggravation de diverses maladies : obésité, diabète et hypertension artérielle. Sa mesure précise reste encore confinée au domaine de la recherche, les deux méthodes les plus utilisées étant le '*glucose clamp*' et le '*minimal model*'. D'autres indices ou méthodes de mesure de la sensibilité à l'insuline ont été proposées : insulinémie à jeun,

rapport insulinémie/glycémie à jeun, test court à l'insuline, perfusion insuline-glucose. Tous présentent des insuffisances (faible reproductibilité ou sensibilité) ou des contraintes (nombre de prélèvements, durée de l'épreuve).

- **Clamp euglycémique hyperinsulinique**

Le clamp euglycémique hyperinsulinique est actuellement considéré comme la méthode de référence pour mesurer la sensibilité à l'insuline *in vivo* [22,202]. Son principe se résume à une perfusion constante d'insuline qui assure un plateau insulinique stable et à une perfusion de glucose à débit variable pour maintenir la glycémie à un niveau stable et constant. L'évaluation de la sensibilité à l'insuline intègre le degré de suppression insulinique de la production hépatique de glucose et de stimulation insulinique de la captation périphérique de glucose. Le sujet étudié sera d'autant plus résistant à l'action de l'insuline que la quantité de glucose perfusée sera faible, et inversement. Diverses méthodes sont utilisées, soient automatisées (Biostatator), soient manuelles.

Dans nos études en cours, nous avons appliqué une méthode manuelle de clamp euglycémique hyperinsulinique, en perfusant en continu 2,5 mU/kg/min d'insuline pendant 2 heures 30 minutes, afin d'atteindre un plateau suffisant entre 100 et 150  $\mu$ U/ml d'insulinémie plasmatique sur la dernière demi-heure. L'euglycémie est obtenue en ajustant les débits de glucose selon les valeurs de glycémies capillaires mesurées toutes les 10 minutes. Ces valeurs sont intégrées dans un logiciel qui permet d'obtenir les débits de glucose adaptés. Les mesures de glycémies et insulinémies plasmatiques sont effectuées toutes les 10 minutes sur la dernière demi-heure. La détermination du taux de glucose perfusé (M de glucose en mg/kg/min.) permet d'apprécier le degré de pénétration cellulaire du glucose sous

l'action de l'insuline, et par conséquent de préciser le degré de sensibilité à l'insuline du sujet étudié.

Compte tenu du caractère invasif, de la complexité et du coût de cette technique de '*glucose clamp*', la méthode alternative simplifiée du HOMA (Homeostasis Model Assessment) a été proposée, en particulier pour les études qui requièrent un nombre important de témoins et/ou de patients.

- **HOMA : Homeostasis Model Assessment**

Cette méthode simple repose sur un modèle mathématique de système de rétrocontrôle glucose-insuline. Elle permet d'apprécier le degré de sensibilité à l'insuline dans le cas d'études réalisées sur de larges cohortes de patients [100]. Ce modèle 'structurel' incorpore des fonctions mathématiques qui décrivent les réponses physiologiques à l'insuline et au glucose des différents organes impliqués dans l'homéostasie glucidique [156]. La détermination des concentrations de glucose et d'insuline à jeun permet d'obtenir une estimation de la fonction pancréatique de la cellule  $\beta$  et de l'insulinosensibilité. En pratique, trois échantillons de sang prélevés à 5 minutes d'intervalle et les moyennes des trois mesures de chaque analyse (glycémie et insulïnémie) permettent d'évaluer la sensibilité à l'insuline par la formule suivante :  $\text{insulïnémie} / (22,5e^{\ln \text{glycémie}})$ , formule qui peut être simplifiée de la façon suivante :  $[\text{glycémie (mmol/l)} \times \text{insulïnémie (mU/l)}] / 22,5$ . Ce test est simple et peu coûteux à réaliser, et est compatible avec des études d'observation et/ou d'intervention effectuées sur de larges cohortes, ou chez des mêmes sujets nécessitant des mesures répétées de ce paramètre.

## V - Méthodes statistiques

Les résultats donnés dans les études sont exprimés en moyenne  $\pm$  déviation standard (texte et tableaux). En revanche, pour une meilleure lisibilité des figures, les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  sem (erreur standard de la moyenne). La normalité des variables est vérifiée par un test d'aplatissement et d'asymétrie, et une transformation logarithmique est effectuée si la distribution des variables étudiées est non gaussienne.

L'analyse du métabolisme lipidique postprandial fait appel à des ANOVA à mesures répétées, pour évaluer l'évolution dans le temps des variables étudiées. Les effets '*temps postprandial*' et '*groupes de sujet*' sont analysés pour chaque étude. La méthode plus spécifique d'aire sous la courbe (ASC) est basée sur la méthode des trapèzes et permet une approche globale de la cinétique postprandiale des paramètres biologiques [157,224]. Afin de tenir compte des valeurs initiales (par exemple celle des triglycérides à jeun), l'application du modèle des aires sous la courbe incrémentales est régulièrement employée. Elle permet d'apprécier spécifiquement les variations postprandiales des paramètres étudiés indépendamment de leurs valeurs basales.

Les comparaisons de moyennes ont été effectuées en utilisant des tests paramétriques (test *t* de Student apparié ou non apparié) lorsque les échantillons de populations étaient importants, ou par des tests non-paramétriques (test U de Mann-Whitney ou test de Wilcoxon) pour des petits échantillons et/ou des variables de distribution non gaussienne. Une analyse de régression linéaire simple est utilisée pour déterminer les coefficients de corrélation entre deux variables quantitatives (test de Spearman). Pour les comparaisons de variables discontinues, un test de Chi-2 a été réalisé. Des analyses de régression multiple pas à pas ou analyse

multivariée ont permis de déterminer les facteurs prédictifs indépendants du métabolisme lipidique postprandial.

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué avec le logiciel StatView (Abacus Concepts Inc., Statview IV et V; Brain Power, Calabasas, CA, USA). Les niveaux de significativité sont donnés pour un  $p < 0,05$ .

## VI - Premier Article (page 183)

### Delayed changes in postprandial lipid in young normolipidemic men after a nocturnal vitamin A oral fat load test

Effet de l'horaire de la prise du repas lipidique sur la lipémie postprandiale chez le sujet normolipidémique

Samy Hadjadj, Jean-Louis Paul, Laurent Meyer, Vincent Durlach, Bruno Vergès, Olivier Ziegler, Pierre Drouin and Bruno Guerci  
*J. Nutr*, 1999, 129, 1649-1655

Correspondence and requests for reprints: Bruno Guerci, M.D.

#### Résumé en français

**Objectif** - Les repas tests lipidiques utilisés pour étudier le métabolisme lipidique postprandial sont généralement effectués de jour. Un test nocturne pourrait être plus adapté et plus physiologique.

**Sujets et méthodes** - Nous avons comparé les réponses lipidiques de 9 jeunes hommes normolipidémiques qui ont reçu un repas test nocturne à 22.00 heures (N) ou diurne (D) à 07.00 heures. Les concentrations de triglycérides et de palmitate de rétinol ont été mesurés pendant 10 heures.

**Résultats** - Les pics plasmatiques et les aires sous la courbe (ASC) des triglycérides après le repas D et le repas N ne sont pas différents significativement [ $2,17 \pm 0,78$  (D) vs  $2,04 \pm 0,87$  mmol/L (N); et  $13,12 \pm 4,45$  (D) vs  $13,74 \pm 5,79$  mmol/(L.h) (N)]. Les pics de concentrations et les aires sous la courbe du palmitate de rétinol pour les deux tests ne sont pas différents [ $1,71 \pm 0,69$  (D) vs  $1,42 \pm 0,66$  mg/L (N); et  $7,17 \pm 3,98$  (D) vs  $6,63 \pm 4,23$  mg/(L.h) (N)]. Le pic diurne de triglycérides apparaît significativement plus tôt ( $4,3 \pm 1,2$  h) que le pic nocturne ( $5,8 \pm 1,7$  h,  $P < 0,05$ ). Nous avons également développé un modèle utilisant uniquement



3 temps postprandiaux (triglycéride à T0, triglycéride au temps moyen du pic (T4 pour le jour et T6 pour la nuit), et triglycéride à T10) pour apprécier la valeur de l'aire sous la courbe conventionnelle et pour réduire le nombre de prélèvements sanguins. Ce modèle simplifié d'aire sous la courbe est fortement corrélé à l'aire sous la courbe conventionnelle, en particulier en période nocturne ( $r = 0,98$   $P < 0,0001$ ).

**Conclusions** - L'épreuve de charge orale en lipides apparaît bien tolérée par les sujets, et les résultats lipidiques postprandiaux de jour et de nuit sont similaires. Enfin, le modèle simplifié en 3 points d'analyse lipidique postprandiale pourrait être appliqué à de larges populations.

**Mots-clés** : lipémie postprandiale, variations circadiennes, repas lipidique test, palmitate de rétinol

## 1 - Argumentaire

### • **Limites méthodologiques des épreuves d'hyperlipidémie provoquée**

Le développement des tests de tolérance lipidique repose sur l'hypothèse que la période postprandiale est plus informative que la période à jeun, si l'on considère qu'un sujet normal, avec trois repas minimum par jour, est plus souvent en période postprandiale qu'à jeun [252]. Il n'existe pas de consensus sur l'horaire auquel les tests de lipémie postprandiale doivent être administrés. Cependant, la majorité des études utilise une méthodologie de prise du repas lipidique le matin à jeun [5], pour une raison simple de faisabilité pour le patient et pour le personnel médical. Deux arguments majeurs s'opposent à cette pratique de repas lipidique donné le matin à jeun :

- Le premier est le caractère non physiologique d'une charge en lipides de 50 à plus de 100 g de lipides absorbée le matin [176,241], alors qu'en réalité la prise alimentaire du dîner est plus importante et plus hyperlipidique que celle du petit-déjeuner et du déjeuner [80,246].

- Le second argument est le non respect du rythme alimentaire circadien lorsque le repas lipidique est ingéré le matin, avec la nécessité de supprimer toute prise alimentaire (hors absorption d'eau) et toute activité physique sur la phase post-absorptive dont la durée varie de 8 à 12 heures selon les auteurs [128].

### • **Evaluation de la lipémie postprandiale en période nocturne**

- Très peu de travaux ont été consacrés à ce sujet. C'est Zampelas *et col.* [248] qui les premiers proposent une prise de la charge lipidique le soir afin de ne pas perturber le rythme physiologique alimentaire. Le pic postprandial de triglycérides (TG) est détecté entre la 5ème et 7ème heure en période nocturne, comparativement à la 4ème heure en période diurne. Toutefois, on ne dispose pas

d'analyse comparative des cinétiques postprandiales entre les périodes diurne et nocturne dans cette étude.

- Les données de Zampelas *et col.* rejoignent celles de Hampton *et col.* qui simulent par une modification de l'horloge biologique de sujets sains travaillant le jour, un décalage horaire correspondant à un travail posté de nuit [103]. L'objectif initial de cette étude était de mettre en évidence des perturbations hormonales chez des travailleurs postés, lesquelles pourraient expliquer en partie le risque cardiovasculaire reconnu plus élevé dans cette population. La période postprandiale analysée était de 6 heures, et l'étude comparative a permis de retrouver des réponses différentes en terme de glycémie et d'insulinémie plasmatique postprandiales. Cependant, la durée trop courte d'analyse n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives des cinétiques lipidiques postprandiales.

- L'équipe de Lille rapporte que les réponses lipidiques postprandiales d'un même repas test pris le jour ou la nuit sont similaires en terme de pic lipidique et d'aires sous la courbe pour les triglycérides, les VLDL-TG et le cholestérol [190]. Les valeurs de pic de triglycérides ne sont pas différentes entre le jour et la nuit. La réponse lipidique postprandiale de VLDL-cholestérol est par contre significativement plus élevée en période nocturne alors que celles du cholestérol-LDL et du cholestérol-HDL sont plus faibles. Ces résultats suggèrent une modification du métabolisme du cholestérol liée au rythme nyctéméral. Cependant, la méthodologie utilisée s'éloigne de la physiologie puisque la charge lipidique nocturne avait été réalisée à 01.00 heure du matin, et la charge diurne à 13.00 heures.

## 2 - Présentation de l'étude

- Nous avons étudié chez 9 hommes témoins normolipidémiques, les réponses lipidiques postprandiales après un repas test donné soit le matin à jeun à 07.00 heures, soit le soir à 22.00 heures, ou inversement selon une attribution au hasard. Chaque repas test était séparé d'un intervalle de  $14 \pm 1$  jours.
- Repas lipidique test et durée de l'épreuve postprandiale sur 10 heures.
- Triglycérides et palmitate de rétinol mesurés dans le plasma.
- Séparation des lipoprotéines exogènes (fraction chylomicron) et endogènes (fraction non-chylomicron) par ultracentrifugation. Dosage des triglycérides et du palmitate de rétinol dans ces sous-fractions lipidiques.

## 3 - Résultats de l'étude

En maintenant une période de jeûne équivalente avant la prise du repas lipidique le matin à 07.00 heures ou le soir à 22.00 heures, nous avons observé les résultats suivants :

- Les cinétiques lipidiques postprandiales observées de jour s'incrivent dans les données de la littérature
- Un décalage dans le temps du pic de triglycérides d'environ 1,5 h est observé pendant la période postprandiale nocturne comparée à la période diurne
- Un décalage dans le temps du pic de palmitate de rétinol d'environ 1 h est observé pendant la période postprandiale nocturne comparée à la période diurne
- Les valeurs de pics et d'aires sous la courbe des paramètres lipidiques postprandiaux sont similaires et significativement corrélées entre le jour et la nuit
- La tolérance digestive du repas test nocturne est meilleure que celle du repas diurne.

#### 4 - Discussion des résultats

Cette étude souligne surtout le caractère plus physiologique de la prise d'une charge lipidique le soir pour l'étude du métabolisme lipidique postprandial. Elle démontre que dans des conditions méthodologiques et nutritionnelles contrôlées, la lipémie postprandiale nocturne est comparable à celle observée de jour.

Le repas test absorbé le soir se rapproche en quantité de lipides ingérés de la ration quotidienne au repas du soir des lipides alimentaires (dans notre étude 75 g en moyenne sur les données de l'enquête alimentaire). Le maintien en position couchée et la non-absorption d'aliments pendant la période d'étude cinétique de la lipémie postprandiale s'adaptent plus volontiers à la période nocturne. Ces arguments plaident en faveur de l'application nocturne des repas lipidiques tests.

Ces données obtenues sur une population de sujets sains doivent bien sûr être confirmées chez des patients atteints de pathologie cardiovasculaire ou susceptibles de présenter des altérations du métabolisme lipidique postprandial. La possibilité d'utiliser un temps prolongé de 10 heures d'analyse, et le ralentissement physiologique nocturne du métabolisme lipidique postprandial, pourraient permettre de potentialiser et de mettre en évidence les différences de comportement postprandial des populations soumises à ces tests.

L'explication de ces résultats reste du domaine de l'hypothèse. Toutefois, certains facteurs sont connus pour influencer les concentrations de lipides plasmatiques. La vidange gastrique, l'hydrolyse des triglycérides intestinaux et la motilité intestinale modulent le taux de triglycérides plasmatiques [49]. Il semble en effet que la vidange gastrique du repas du matin soit plus rapide que celle du soir. Goo *et col.* ont fait ingérer à des témoins le même repas à 08.00 heures et à 20.00

heures, repas constitué de pain, banane, pomme, lait écrémé et jus d'orange, pour un total calorique de 587 Kcalories. En période nocturne, la vidange gastrique des liquides était ralentie de 15 p. 100 et celle des solides de 50 p. 100 par rapport à celle du matin [90]. Ces éléments sont compatibles avec la notion de diminution nocturne de la tolérance glucosée [233], liée à une diminution de la sensibilité à l'insuline en période nocturne. Par ailleurs, nous avons montré dans notre étude qu'il était possible de réduire le nombre de temps d'analyse postprandiale à trois prélèvements, ce qui faciliterait à terme la réalisation de ce type d'épreuve dynamique (voir article n°4).

## **5 - Conclusions**

Nous démontrons dans cette étude pilote que les cinétiques lipidiques postprandiales sont similaires de jour comme de nuit, en se fondant sur les valeurs d'aires sous la courbe et de pics lipidiques postprandiaux. Le simple décalage d'une à deux heures de la courbe de triglycérides et de palmitate de rétinol en période nocturne peut s'expliquer par des conditions de physiologie digestive et métabolique différentes la nuit. Les moindres variations biologiques observées en période nocturne comparée à la période diurne constituent un résultat en faveur de l'application de ces tests de charge en lipides sur la période nocturne. Par contre, cette méthodologie nocturne nécessite une flexibilité horaire du personnel médical et para-médical, avec un coût supérieur comparé au travail de jour. Le sommeil des sujets étudiés peut également être perturbé lors de ces analyses nocturnes. Il est enfin impératif de valider ce concept de charge lipidique nocturne au sein de populations pathologiques, afin de déterminer si le pouvoir discriminant des épreuves diurnes est maintenu en période d'analyse nocturne.

## VII - Deuxième Article (page 190)

### **Relationship between altered postprandial lipemia and insulin resistance in normolipidemic and normoglucose tolerant obese patients**

Rôle de l'insulinorésistance sur les altérations de la lipémie postprandiale chez le sujet obèse non diabétique normolipidémique

Bruno Guerci, Bruno Vergès, Vincent Durlach, Samy Hadjadj, Pierre Drouin and Jean-Louis Paul

*Int. J. Ob, 2000, 24, 468-478*

Correspondence and requests for reprints: Bruno Guerci, M.D.

#### **Résumé en français**

**Objectifs** - Des altérations lipidiques postprandiales sont décrites au cours de l'obésité, mais elles sont intimement liées à des anomalies du bilan lipidique à jeun, en particulier des triglycérides. Nous avons étudié une population de sujets obèses non diabétiques et normolipidémiques, pour déterminer l'association potentielle entre les caractéristiques cliniques et biologiques de l'obésité et de l'insulinorésistance et la lipémie postprandiale.

**Sujets et méthodes** - Cette étude a été conduite chez 17 sujets obèses androïdes normotolérants au glucose (IMC =  $34,3 \pm 3,1$  kg/m<sup>2</sup>) comparés à 33 sujets de poids normal (IMC =  $21,8 \pm 1,6$  kg/m<sup>2</sup>) après absorption d'un repas riche en lipides et contenant de la vitamine A (890 KCal, 85% de lipides). Les prélèvements sanguins ont été effectués avant la prise du repas test, et 2, 3, 4, 5, 6 et 8 heures après. La sensibilité à l'insuline a été déterminée par la méthode du HOMA. Les triglycérides et le palmitate de rétinol ont été mesurés dans le plasma, les fractions chylomicrons

et ne contenant pas de chylomicrons, à chaque temps.

**Résultats** - Les aires sous la courbe (ASC) des triglycérides des chylomicrons pour les obèses et les témoins ne sont pas significativement différentes, suggérant que l'activité lipolytique n'est pas altérée. En revanche, l'aire sous la courbe des triglycérides de la fraction non-chylomicron est significativement plus élevée chez les obèses que chez les témoins ( $512 \pm 135$  vs  $429 \pm 141$  mmol/l.min.,  $P < 0,01$ ). De plus, l'aire sous la courbe du palmitate de rétinol dans cette même fraction non-chylomicron est significativement plus faible chez les obèses que chez les témoins ( $103 \pm 55$  vs  $157 \pm 88$  mg/l.min.,  $P < 0,05$ ), suggérant que les triglycérides des lipoprotéines endogènes interviennent en grande partie dans l'augmentation des triglycérides de la fraction non-chylomicron. Les paramètres relatifs à l'obésité ne sont pas corrélés aux anomalies de la lipémie postprandiale, alors que le HOMA, significativement différent entre les deux groupes étudiés, explique en partie ( $r^2 = 23\%$ ,  $P < 0,01$ ) l'augmentation significative des triglycérides de la fraction non-chylomicron.

**Conclusions** - Les patients obèses androïdes, dont les triglycérides à jeun sont normaux et similaires à ceux de sujets de poids normal, ont une réponse lipidique postprandiale altérée, touchant en particulier les triglycérides de la fraction non-chylomicron. Ces altérations peuvent être consécutives à des modifications postprandiales des lipoprotéines endogènes, en relation avec une diminution de la sensibilité à l'insuline.

**Mots-clés.** Lipémie postprandiale, obésité, insulino-résistance, repas lipidique test, palmitate de rétinol, lipoprotéines riches en triglycérides



## 1 - Argumentaire

### • Difficultés méthodologiques

Les altérations des lipides plasmatiques à jeun (augmentation des triglycérides et diminution du cholestérol-HDL, en particulier du HDL2) sont fréquentes au cours de l'obésité [63]. Ces anomalies lipidiques peuvent participer, au moins en partie à l'augmentation du risque cardiovasculaire observé dans cette population. Cependant, le risque cardiovasculaire demeure élevé chez les sujets obèses dont le profil lipidique à jeun et la tolérance glucosée sont normaux [116].

Le rôle des altérations lipidiques postprandiales peut être évoqué. Plusieurs études ont rapporté des anomalies du métabolisme lipidique postprandial chez des sujets obèses [51,148], mais la majorité de celles-ci s'adressent à des populations présentant une dyslipidémie pré-existante à jeun ou une augmentation significative des triglycérides comparativement à la population de sujets témoins. Or, ces paramètres sont connus pour influencer la réponse lipidique postprandiale. Par conséquent, dans ces études, il est difficile d'apprécier le rôle spécifique de l'obésité dans l'interprétation des altérations lipidiques postprandiales, indépendamment des anomalies lipidiques à jeun.

### • Obésité et lipoprotéines d'origine hépatique

L'accumulation des remnants de lipoprotéines riches en triglycérides dans la circulation plasmatique peut conduire à des altérations métaboliques dont le risque athérogène est clairement établi [169]. Au cours de l'obésité, une augmentation de production de VLDL [51,148] et/ou un déficit du catabolisme des lipoprotéines hépatiques [159] sont suspectés. Un afflux d'acides gras libres (AGL) au niveau du foie favoriserait cette synthèse hépatique de VLDL-TG, qui est observée tardivement 6 heures après l'ingestion d'un repas lipidique test [24]. Cet afflux d'acides gras

libres pour le foie en période postprandiale dépend de l'hydrolyse des triglycérides provenant de lipoprotéines riches en triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase, mais également plus tardivement du degré de lipolyse adipocytaire [79].

- **Insulinorésistance et altérations lipidiques postprandiales**

Compte tenu du rôle central de l'insuline dans le métabolisme lipidique, l'hyperinsulinisme et/ou la diminution de la sensibilité à l'insuline qui est associée à l'obésité peuvent participer à la genèse des anomalies lipidiques postprandiales du sujet obèse.

Schrezenmeir *et col.* [205] retrouvent chez les sujets qualifiés de *mauvais épurateurs* des lipides plasmatiques, des concentrations d'insuline plasmatique significativement plus élevées à jeun comparativement à des sujets qualifiés de *bons répondeurs*. Boquist *et col.* [31] rapportent sur une large population d'hommes d'âge moyen, une amplitude d'autant plus marquée de l'augmentation des triglycérides postprandiaux que l'insulinémie à jeun est élevée.

La diminution de la sensibilité à l'insuline et la répartition abdominale du tissu adipeux chez l'obèse jouent un rôle majeur. Une relation étroite entre le '*steady state plasma glucose*' (indice d'insulinosensibilité) et l'amplitude d'augmentation postprandiale des triglycérides et du palmitate de rétinol a été démontrée chez des patients obèses non diabétiques [122], suggérant que les altérations lipidiques postprandiales s'inscrivent comme un élément du syndrome d'insulinorésistance. Couillard *et col.* démontrent qu'à masse grasse équivalente, la répartition androïde du tissu adipeux est un élément prédicteur des variations du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides [51]. Mekki *et col.* confirment cette notion, en montrant que seules les femmes dont la répartition du tissu adipeux est de type

androïde, qu'elles soient normo- ou hypertriglycéridémiques, ont des altérations du métabolisme postprandial [159].

- **Interférences entre les lipoprotéines hépatiques et intestinales en période postprandiale**

L'effet freinateur de l'insuline sur la lipolyse est en effet réduit dans les situations d'insulinorésistance, favorisant la biodisponibilité des acides gras libres. Le phénomène de compétition pour la lipoprotéine lipase entre les chylomicrons et les VLDL favorise l'accumulation des VLDL, la lipoprotéine lipase à la surface des capillaires de la cellule endothéliale agissant préférentiellement sur les chylomicrons [111]. Enfin, une diminution de l'action de la lipoprotéine lipase (sous dépendance insulinique) dans les situations d'insulinorésistance est susceptible d'altérer le processus de lipolyse. La diminution de la sensibilité à l'insuline peut ainsi contribuer à une hyperproduction de lipoprotéines riches en triglycérides d'origine hépatique et à une diminution du catabolisme de ces lipoprotéines.

## **2 - Présentation de l'étude**

Compte tenu des éléments rapportés ci-dessus, nous avons exploré le métabolisme lipidique postprandial de 17 patients obèses comparés à 33 sujets témoins de poids normal. Les patients obèses répondaient aux critères de sélection suivants :

- Patients obèses de sexe masculin et féminin (IMC =  $34,3 \pm 3,1$  kg/m<sup>2</sup>)
- Répartition androïde de la masse grasse (rapport taille/hanches > 0,85 pour les femmes et > 0,95 pour les hommes)
- Bilan lipidique à jeun normal : triglycéridémie à jeun =  $0,92 \pm 0,24$  mmol/L (non différente de celle des témoins)
- Sujets non diabétiques et normotolérants au glucose.

Les variables étudiées sont les suivantes :

- Repas lipidique test et durée de l'épreuve postprandiale de 8 heures
- Triglycérides et palmitate de rétinol dans le plasma
- Séparation des lipoprotéines exogènes (fraction chylomicron) et endogènes (fraction non-chylomicron) par ultracentrifugation. Dosage des triglycérides et du palmitate de rétinol dans ces fractions lipidiques
- Etude de la sensibilité à l'insuline (méthode du HOMA).

### **3 - Résultats de l'étude**

Le métabolisme lipidique postprandial des patients obèses normolipidémiques et indemnes d'anomalie de la tolérance glucosée, est caractérisé par les éléments suivants :

- Sachant que les concentrations de palmitate de rétinol (marqueur vitaminique des lipoprotéines d'origine intestinale) sont normales voire basses dans la fraction non-chylomicron, la persistance de concentrations élevées de triglycérides dans cette fraction lipidique suggère une origine hépatique à cette augmentation plasmatique de triglycérides
- En revanche, l'absence de différences sur les concentrations de triglycérides et de palmitate de rétinol dans la fraction chylomicron suggère que le métabolisme de la voie exogène des triglycérides n'est pas perturbé chez le sujet obèse
- Les analyses univariées et multivariées montrent que les paramètres liés à l'obésité *per se* (indice de masse corporelle, rapport taille/hanches, concentration de leptine plasmatique) ne sont pas prédicteurs des anomalies lipidiques postprandiales observées dans notre population de sujets obèses. Par contre, la diminution de la sensibilité à l'insuline (appréciée par la méthode du HOMA)

explique jusqu'à 23 p. 100 de la variance de ces altérations, et ceci après ajustement sur l'âge et le sexe.

#### **4 - Discussion des résultats**

Ces résultats rejoignent les données de certaines études qui n'avaient pu que suggérer sans la démontrer, l'implication des lipoprotéines d'origine hépatique dans les phénomènes postprandiaux chez le sujet obèse [148,234]. D'autres auteurs, se fondant sur une méthodologie plus précise de séparation des lipoprotéines plasmatiques, ont démontré le rôle des VLDL dans l'hypertriglycéridémie postprandiale de sujets coronariens [131]. Il n'est cependant pas possible de faire la part des choses entre une hyperproduction et/ou un défaut de catabolisme des lipoprotéines d'origine hépatique. La seconde hypothèse est la plus vraisemblable, compte tenu des phénomènes de compétition pour la lipolyse par la lipoprotéine lipase entre les chylomicrons et les VLDL, au profit des chylomicrons.

Dans notre étude, nous avons également démontré l'absence de particularité de la réponse lipidique selon le sexe, pour autant que les paramètres lipidiques à jeun soient similaires. Nous avons par ailleurs confirmé le ralentissement de l'épuration lipidique lié à l'âge [47,212].

#### **5 - Conclusions**

Les sujets atteints d'obésité, en l'absence d'anomalies du métabolisme glucosé ou du bilan lipidique à jeun, présentent cependant des altérations du métabolisme lipidique postprandial. Ces anomalies lipidiques sont liées à la diminution de la sensibilité à l'insuline. Elles sont caractérisées par une compétition marquée lors de

la période postprandiale entre les lipoprotéines d'origine exogène et celles d'origine endogène, aboutissant à une accumulation des lipoprotéines d'origine hépatique.

Enfin, cette étude permet de démontrer qu'un simple bilan lipidique à jeun ne permet pas de prédire l'existence d'anomalies potentiellement athérogènes du métabolisme des lipides que seul un test de charge orale en lipides permet de mettre en évidence.

## VIII - Troisième Article (page 201)

### **No acute response of leptin to an oral fat load in obese patients and during circadian rhythm in healthy controls**

Relation entre la leptine plasmatique et la prise aiguë de lipides au cours d'un repas test chez le sujet obèse et au cours du nyctémère chez le sujet sain

Bruno Guerci, Samy Hadjadj, Didier Quilliot, Olivier Ziegler and Pierre Drouin

*Eur. J. Endocrinol, 2000, 143, 649-655*

Correspondence and requests for reprints: Bruno Guerci, M.D.

#### **Résumé en français**

**Objectif** - Cette étude a été conduite pour déterminer les relations entre l'obésité et la leptine en période postprandiale, et pour évaluer l'existence d'un rythme circadien de la leptine.

**Sujets et méthodes** - Dans une première étude (étude 1), nous avons étudié les réponses plasmatiques de leptine et d'insuline à un repas lipidique test chez 16 sujets obèses non-diabétiques et 16 sujets témoins, appariés sur le sexe et l'âge. Dans une seconde étude (étude 2), nous avons étudié les réponses plasmatiques de leptine et d'insuline à un repas lipidique test selon l'horaire de prise du repas test : à 07.00 heures [test diurne, (D)] ou à 22.00 heures [test nocturne (N)] chez 9 sujets sains de sexe masculin.

**Résultats** - Les concentrations plasmatiques de leptine à jeun sont corrélées avec l'indice de masse corporelle, la masse grasse et le pourcentage de masse grasse dans les deux études. Les concentrations plasmatiques de leptine sont plus élevées chez la femme que chez l'homme ( $P < 0,001$ ). Dans l'étude 1, les concentrations plasmatiques de leptine sont plus élevées chez les obèses que chez les sujets de

poids normal, mais ne varient pas en période postprandiale quelque soit le groupe étudié. Les concentrations plasmatiques d'insuline à jeun et en période postprandiale, de même que l'aire sous la courbe de l'insulinémie, sont plus élevées chez les obèses que chez les témoins ( $P < 0,05 - 0,0001$ ). Nous n'avons observé de relation entre les réponses postprandiales d'insuline et de leptine, ni chez les obèses, ni chez les témoins de poids normal.

Dans l'étude 2, les concentrations de leptine (D:  $2,9 \pm 1,4$  vs N:  $2,9 \pm 1,0$  ng/mL) et d'insuline (D:  $41 \pm 18$  vs N:  $25 \pm 9$  pmol/L) sont similaires au début du repas test de jour et de nuit après 10 heures de jeûne. Les concentrations plasmatiques de leptine ne sont pas significativement différentes et ne varient pas après le repas test donné de jour ou de nuit.

**Conclusions** - Nos résultats indiquent que les concentrations de leptine chez les sujets sains et les patients obèses ne sont pas régulées en aiguë par les lipides alimentaires.

**Mots-clés** : leptine, repas lipidique test, obésité, rythme circadien



## 1 - Argumentaire : rappel sur la leptine

### • Leptine et tissu adipeux

La leptine, sécrétée essentiellement par les adipocytes, est une hormone polypeptidique produite par le gène *Ob* dont le clonage chez la souris et l'homme a été réalisé en 1994 [251]. Le gène *Ob* est exprimé dans le tissu adipeux blanc mature, de manière variable selon la localisation du tissu adipeux. Chez l'Homme, le gène *Ob* est plus électivement exprimé dans le tissu adipeux sous-cutané, comparativement au tissu adipeux omental, rétropéritonéal ou mésentérique.

Dans la plupart des modèles d'obésité génétique (souris *db/db*, souris agouti, rat Zucker..) le taux d'ARN messager du gène *Ob* est augmenté dans le tissu adipeux. Parallèlement, les concentrations plasmatiques de leptine sont élevées. Par analogie, le gène de la protéine *Ob* est exprimé normalement dans les adipocytes de sujets obèses qui apparaissent comme résistants à l'action de la leptine circulante.

Le modèle de la souris *Ob/Ob* fait exception, du fait d'une mutation par codon stop qui rend la protéine non fonctionnelle. Cela se traduit par l'augmentation de l'ARNm du gène *Ob* alors les taux plasmatiques sont indétectables. Ainsi, chez les souris *Ob/Ob*, l'administration de leptine recombinante diminue significativement de 30 p. 100 le poids de ces souris, effet qui n'est pas observé chez les souris *db/db*, chez lesquelles prédomine une anomalie au niveau du récepteur de la leptine [102].

Chez l'Homme, il existe une corrélation positive entre la concentration plasmatique de leptine et l'indice de masse corporelle [50], le pourcentage [66,192] et la quantité de masse grasse [50,152]. Ces corrélations sont également observées pour l'ARNm du gène *Ob*, mais il existe de fortes disparités dans les concentrations de leptine pour des sujets dont l'adiposité est proche ou similaire, que certains

auteurs expliquent par une résistance variable à l'action de la leptine. Enfin, les concentrations de leptine sont classiquement plus élevées chez la femme que chez l'homme [196].

- **Leptine et variations pondérales**

La leptine joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme énergétique, dans le stockage adipocytaire et dans le contrôle pondéral. Sa fonction dans le contrôle de la satiété et de la prise alimentaire est clairement établie.

Ainsi, de faibles variations du poids se traduisent par des variations parfois considérables des concentrations de leptine plasmatique. Kolaczynski *et col.* ont démontré qu'une diminution de 10 p. 100 du poids du corps s'accompagnait d'une réduction de plus de 50 p. 100 des concentrations de leptine [137]. Inversement, une augmentation de 10 p. 100 du poids du corps à l'occasion d'une suralimentation pendant 5 semaines est associée à une augmentation de 300 p. 100 des concentrations de leptine [137]. Ces relations entre les variations des concentrations de leptine plasmatique et celles du poids ou de la masse grasse ne sont cependant pas systématiquement retrouvées par tous les auteurs [135,239].

- **Leptine, prise alimentaire et macronutriments**

La leptine pourrait jouer un rôle de '*sensor*' de la balance énergétique, en particulier en situation aiguë. Le jeûne se traduit par un effondrement des concentrations de leptine dans les 12 premières heures [135], la diminution atteignant 84 p. 100 du taux initial après 60 heures de jeûne. Cet effondrement des concentrations de leptine est rapidement corrigé après la reprise de l'alimentation pour se normaliser, selon les études, dans les 12 à 48 heures [135,137,239]. Cette diminution du taux de leptine qui peut atteindre 72 p. 100 du taux initial après 52 heures de jeûne, s'effectue indépendamment de variations de la masse grasse qui n'excèdent pas 1

p. 100 [30]. Le taux d'ARNm du gène *Ob* semble moins sensible aux effets de variations alimentaires. Dans l'étude de Kolaczynski *et col.* [135], l'expression du gène *Ob* est réduite de 15 p. 100 alors que les concentrations plasmatiques de leptine baissent de 84 p. 100. Dans le travail de Vidal *et col.*, 5 jours de régime hypocalorique (400 Kcal/jour) ne modifient pas le taux d'ARNm du gène *Ob* [235].

Le type d'alimentation pourrait influencer la réponse de la leptine à la prise alimentaire. Cette régulation constitue une piste intéressante dans le domaine des effets satiétogènes des aliments et du rôle de la leptine dans le contrôle de la prise alimentaire. Il convient alors de distinguer la prise alimentaire aiguë de la prise chronique, mais aussi la part respective du type d'aliment sur l'évolution des concentrations plasmatiques de leptine.

- **Régulation circadienne des concentrations de leptine**

Un rythme circadien de la sécrétion de la leptine a été décrit [211], que certains auteurs relient à l'accumulation des prises alimentaires au cours de la journée. Classiquement, on observe une augmentation de la leptine au cours du nycthémère jusqu'à minuit, puis une diminution de ces concentrations avec retour au niveau basal en début de matinée. Ces variations nycthémérales de la leptine plasmatique seraient liées à l'action de l'insuline, et en particulier au degré de sensibilité à l'insuline. Boden *et col.* l'ont clairement démontré chez des sujets maintenus à jeun pendant 72 heures sous clamp euglycémique normo- ou hyperinsulinique [29].

## 2 - Présentation de l'étude

1) Compte tenu de l'effet satiétogène potentiel de la leptine, et des variations de réponse postprandiale de la leptine selon la composition nutritionnelle du repas test utilisé (composition en glucides et lipides, en particulier),

2) Compte tenu de la régulation nycthémerale de leptine dont la réalité et l'étiologie restent discutées,

nous avons étudié deux populations, la première comportant 16 sujets obèses comparés à 16 sujets de poids normal, et la seconde composée de 9 sujets témoins mis en situation identique de jeûne diurne ou nocturne. Dans ces deux études, l'évolution des concentrations plasmatiques de leptine a été étudiée à jeun et après ingestion d'un repas riche en lipides.

### Etude 1

- 16 sujets témoins et 16 patients obèses appariés sur le sexe et l'âge.
- Lipémie postprandiale sur une durée de 8 heures suivant l'ingestion d'un repas riche en lipides.
- Concentrations plasmatiques de leptine déterminées à jeun et en période postprandiale.
- Triglycérides et palmitate de rétinol dans le plasma.
- Etude de la sensibilité à l'insuline (méthode du HOMA).

### Etude 2

- 9 sujets contrôles normolipidémiques et de poids normal.
- Période de jeûne équivalente de 10 heures avant la prise du repas lipidique test à 07.00 heures ou à 22.00 heures.
- Période d'analyse de 8 heures après l'ingestion du repas lipidique test.

- Concentrations plasmatiques de leptine déterminées à jeun et en période postprandiale diurne et nocturne.
- Triglycérides et palmitate de rétinol dans le plasma.

### **3 - Résultats de l'étude**

#### **Etude 1**

- Concentrations plasmatiques de leptine corrélées aux caractéristiques anthropométriques des populations étudiées.
- Concentrations de leptine plus élevées chez les femmes comparativement aux hommes, et ceci indépendamment du niveau d'adiposité des sujets.
- Absence de variation des concentrations de leptine sur les 8 heures suivant la prise du repas riche en lipides.
- Concentrations de leptine étroitement corrélées au degré de sensibilité à l'insuline évaluée par la méthode du HOMA.
- Réponse insulinique postprandiale plus marquée chez les sujets obèses que chez les témoins, mais sans relation avec les concentrations plasmatiques postprandiales de leptine.

#### **Etude 2**

- Concentrations plasmatiques de leptine similaires le matin à 07.00 heures et le soir à 22.00 heures si une période identique de 10 heures de jeûne est respectée préalablement à la prise du repas test le matin et le soir.
- Pas de modification des concentrations plasmatiques de leptine en période postprandiale, de jour comme de nuit.
- Absence de rythme circadien vrai des concentrations de leptine indépendamment des prises alimentaires quotidiennes successives.

## 4 - Discussion des résultats

### Etude 1

- Nous confirmons les données précédemment publiées sur les relations existant entre la concentration de leptine et le degré d'adiposité des sujets étudiés [50,66,152,192].
- Nous n'observons pas de réponse postprandiale des concentrations de leptine après la prise d'un repas riche en lipides. Ces résultats sont concordants avec ceux publiés par d'autres auteurs comme Sinha *et col.* [211] et Considine *et col.* [50]. Weigle *et col.* ne retrouvent pas de différence que le repas soit riche (50%) ou pauvre (10%) en lipides [239]. Havel *et col.* [109] ont comparé l'effet d'un repas riche (60%) ou pauvre en lipides (20%) et démontré que l'alimentation riche en lipides entraînait une augmentation plus faible des concentrations de leptine qu'un repas riche en glucides [109]. L'augmentation significative de la concentration de leptine n'apparaît qu'après la prise de deux des trois repas de la journée (soit après plus de 10 heures de suivi métabolique), ce qui suggère un effet satiétogène moindre d'une alimentation hyperlipidique comparée à une alimentation hyperglucidique.
- La leptine ne semble pas intervenir sur les phénomènes de satiété et de rassasiement à court terme [191]. Les études qui à l'inverse retrouvent une relation entre la prise alimentaire et les concentrations de leptine, font appel à des repas hyperglucidiques qui favorisent une réponse insulinique exacerbée, susceptible de réguler la sécrétion de leptine. C'est le cas de l'étude réalisée par Dallongeville *et col.* [54] qui rapportent à la 6ème heure suivant la prise d'un repas hyperglucidique, une augmentation significative des concentrations plasmatiques de leptine, parallèlement à une augmentation des concentrations d'insulinémie plasmatique (400 à 500 pmol/l), valeurs susceptibles de moduler les concentrations de leptine.

Quelques études ont à l'inverse observé une diminution des concentrations de leptine plasmatique à la suite d'une charge orale en glucose ou d'un repas riche en glucides (60%) [138,174]. Cette baisse de la leptine serait plus spécifiquement liée au nadir des concentrations de leptine qui se situe entre 08.00 heures et 13.00 heures selon les études [109,138,198,204].

- La réponse de la leptine à la prise alimentaire est divergente et ceci pour plusieurs raisons : l'absence de standardisation des différents repas tests en quantité calorique, mais aussi le type de nutriments. La durée des épreuves alimentaires peut également influencer la réponse postprandiale de la leptine. Quatre études ont analysé la réponse postprandiale de la leptine sur des durées allant de 1h30 à 3 heures suivant un repas test [50,53,211,239]. Ce délai est probablement insuffisant pour mettre en évidence des variations dynamiques des concentrations de leptine. Le type de repas utilisé intervient également : repas usuel de midi [53], ou charge orale en glucose sur 2 heures [196]. Enfin, la répartition en glucides, lipides et protéines des repas peut différer très largement d'une étude à une autre.
- La sélection des populations peut interférer sur les résultats, un travail récent faisant état de l'absence de réponse des concentrations de leptine à la suite de l'injection intra-péritonéale de glucose chez des souris obèses, alors qu'une réponse positive est observée chez des souris de poids normal [164].
- Les mécanismes régulateurs de ces variations de concentrations plasmatiques de leptine au cours de la prise alimentaire seraient surtout liés à l'effet de l'insuline sur la leptine, mais ce rôle demeure controversé [89].

Administrée en aiguë sur une courte période (3 heures), selon une méthode de clamp euglycémique hyperinsulinique, l'insuline ne semble pas avoir d'action

régulatrice sur la production de leptine plasmatique [53], et encore moins sur la régulation du gène *Ob* [235]. En administration chronique, mais à des concentrations supra-physiologiques après un clamp hyperglycémique hyperinsulinique de 72 heures, l'insuline entraîne *in vivo* une augmentation des concentrations de leptine au cours des dernières 24 heures du clamp, ainsi qu'une surexpression *in vitro* du gène *Ob* dans les adipocytes [136]. Ces résultats sont confirmés par Utriainen *et col.* [231], au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinique de 6 heures à des concentrations d'insulinémie plasmatique approchant ou excédant 600 à 900 pmol/l.

Dans notre étude, les concentrations postprandiales d'insulinémie plasmatique étaient faibles (environ 100 pmol/l), et inférieures à celles nécessaires à une régulation de la sécrétion de leptine sous l'action de l'insuline [136,154,197,231].

D'autres hypothèses de régulation de la leptine ont été proposées, en particulier le rôle du glucose, des acides gras libres ou des corps cétoniques. Les acides gras libres ou leur dérivés biochimiques ne semblent pourtant pas jouer un rôle déterminant [29,135]. La régulation de l'expression du gène *Ob* et de la sécrétion de la protéine pourrait être liée au métabolisme du glucose [110], mais des auteurs ont démontré que cette régulation serait sous contrôle insulinique indépendamment des concentrations plasmatiques de glucose [29].

## Etude 2

- Nos résultats sont concordants avec ceux de Dallongeville *et col.* sur l'absence de régulation nyctémérale de la leptine [54]. Inversement, Havel *et col.* [109] Sinha *et col.* [211] et Saad *et col.* [198] observent une régulation nyctémérale des concentrations de leptine enregistrées sur une période de 24 heures. Mais aucune



période de jeûne n'avait été imposée aux témoins de ces études, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. L'augmentation de la leptine est probablement liée à l'effet cumulatif de la prise alimentaire, comme le souligne Schoeller *et col.* [204]. Les résultats de ce travail sont confirmés par une étude originale au cours de laquelle le pic et le nadir de leptine sont inversés lorsque les sujets sont artificiellement mis en situation de décalage horaire. L'inversion de la courbe de leptine observée à l'occasion de ce décalage horaire, est indépendante de celle de certaines hormones comme le cortisol, ce qui renforce l'hypothèse que la leptine n'est pas régulée par un rythme circadien propre [204]. L'absence d'influence directe des glucocorticoïdes a par ailleurs été confirmée dans deux autres études [54,109]. Enfin, il n'est pas démontré que les variations circadiennes de la leptine jouent un rôle prépondérant dans le contrôle du poids et/ou de la balance énergétique. Cependant, la rythmicité des concentrations de leptine sur 24 heures est moindre chez les sujets obèses comparés aux sujets de poids normal [198]. L'insulinorésistance qui caractérise les sujets obèses pourrait expliquer en partie l'élévation plus modérée de leur concentration de leptine au cours de la journée et de la nuit. Cette influence de l'insuline est indiscutablement à prendre en compte pour comprendre les variations nyctémérales de la leptine. La concentration d'insulinémie plasmatique [191] ou la sensibilité périphérique à l'insuline, ainsi que d'autres hormones, sont sujets à des variations nyctémérales. Dans notre étude, la similitude des valeurs du HOMA le matin et le soir et des insulinémies plasmatiques à jeun comme en postprandial est une explication à l'absence de variation des concentrations de leptine entre le jour et la nuit.

## 5 - Conclusions

La prise aiguë de lipides ne modifie pas significativement les concentrations de leptine. La régulation entre la prise alimentaire et la sécrétion de leptine, si elle existe, est probablement liée à l'accroissement de la masse grasse au cours d'une alimentation hyperlipidique à moyen et long terme [126]. Cette régulation dépend de modifications du métabolisme glucose-insuline, mais n'implique pas les phénomènes de satiété ou de rassasiement [191]. Quant au rôle des pics insuliniques postprandiaux dans la régulation de la leptine, il est probablement mineur au cours d'une alimentation physiologique.

Le concept initial selon lequel les concentrations élevées de leptine favorisent la sensation de satiété, et inversement la baisse de ces concentrations constitue un signal de prise alimentaire doit tenir compte des phénomènes de résistance à l'action de la leptine. En effet, certains sujets obèses ont un appétit conservé et supérieur à celui de sujets de poids normal alors que leurs concentrations de leptine sont élevées.

Enfin, nos résultats vont à l'encontre d'une régulation hormonale nyctémérale des concentrations de leptine. L'accumulation des prises alimentaires de la journée explique en grande partie les variations de leptine classiquement observées sur l'ensemble du nyctémère.

A la lecture des données de la littérature, et sur la base de nos résultats, il apparaît que la seule mesure de la leptine à jeun est insuffisante dans la compréhension de sa régulation et de son rôle sur le plan nutritionnel.

## IX - Quatrième Article (page 208)

### Analysis of the Postprandial Lipid Metabolism: Use of a 3-Point Test

Standardisation et simplification des méthodes d'exploration de la lipémie postprandiale avec un modèle en 3 points

Bruno Guerci, Jean-Louis Paul, Samy Hadjadj, Vincent Durlach, Bruno Vergès, Nebil Attia, Anik Girard-Globa, Pierre Drouin

*Diab Metab, 2001, in press*

Correspondence and requests for reprints: Bruno Guerci, M.D.

#### Résumé en français

**Objectif** - Les tests de charge orale en lipides utilisés pour étudier la lipémie postprandiale nécessitent le plus souvent un investissement en temps pour des analyses répétées, complexes et coûteuses. L'utilisation d'un test simplifié limitant le nombre de prélèvements sanguins peut constituer une réponse plus adaptée à la pratique clinique.

**Sujets et méthodes** - Nous avons ainsi évalué un modèle susceptible d'analyser la lipémie postprandiale tout en diminuant le nombre de prélèvements pour 33 sujets témoins de poids normal et 17 sujets obèses normolipidémiques (étude 1), 10 patients diabétiques de type 2 normolipidémiques et 7 témoins (étude 2), et 10 patients diabétiques de type 2 hyperlipidémiques analysés avant et après un traitement hypolipémiant (étude 3). Les analyses biologiques ont été effectuées à jeun et sur une durée de 8 heures suivant l'ingestion d'un repas lipidique test contenant de la Vitamine A. Les concentrations de triglycérides (TG) et de palmitate de rétinol (RP) ont été mesurées dans le plasma total, les sous-fractions lipidiques contenant des chylomicrons (CM) et celles dépourvues de chylomicrons (nCM). Pour

l'analyse de la lipémie postprandiale, les aires sous la courbe conventionnelles (ASCc utilisant 5 à 7 analyses lipidiques) ont été comparées à une mesure simplifiée d'aire sous la courbe n'utilisant que 3 points de cinétique postprandiale (ASCp : triglycérides à T0, triglycérides au temps moyen du pic postprandial (T4), et triglycérides à T8).

**Résultats** - Les ASCc et ASCp des triglycérides et du palmitate de rétinol sont significativement corrélées quelque soit la fraction lipidique analysée dans les 3 études ( $r=0,664-0,995$ ,  $p < 0,0001$ ). La comparaison des ASCp entre les sujets témoins et les patients donne des résultats similaires à ceux obtenus avec l'ASCc.

**Conclusions** - Le modèle simplifié en 3 points pour l'analyse de la lipémie postprandiale apparaît intéressant pour évaluer à plus large échelle l'étude du métabolisme lipidique postprandial.

**Mots-clés** : lipémie postprandiale, repas lipidique test, lipoprotéines riches en triglycérides, palmitate de rétinol, standardisation, obésité, diabète de type 2 .

## 1 - Argumentaire

### • Lipémie postprandiale et risque vasculaire

L'exploration du métabolisme lipidique postprandial apporte des données complémentaires et spécifiques aux seules données lipidiques à jeun. Néanmoins, la lourdeur de la méthodologie en limite la réalisation et donc le développement à plus large échelle. Les altérations de la lipémie postprandiale constituent un marqueur de risque cardiovasculaire indépendant [177]. Cependant, aucune étude prospective ne permet de considérer ces altérations comme un facteur indépendant de risque cardiovasculaire.

### • Nombre de prélèvements postprandiaux

Les études les plus importantes ont été conduites sur des populations n'excédant que rarement plus de 100 sujets [206,241], et toujours inférieures à 200 sujets. Dans ces conditions, les paramètres étudiés sont limités compte tenu de la lourdeur des protocoles, alors que paradoxalement le nombre de prélèvements sanguins reste élevé. Classiquement 5 à 8 temps de cinétique postprandiale sont analysés [51,93,159], mais ce nombre peut aller jusqu'à 12 prélèvements [148], voire plus. Il est alors tout aussi paradoxal de constater que seuls quelques points de cinétique (et souvent les mêmes) sont utilisés à des fins d'explications physiopathologique et/ou mécanistique. Pourtant, en terme d'épidémiologie, des cohortes plus importantes de patients et de témoins sains sont indispensables pour mieux comprendre la place et l'importance des altérations lipidiques postprandiales par rapport aux autres facteurs de risque cardiovasculaire.

### • Durée des épreuves d'hyperlipémie postprandiale

La majorité des études sont conduites sur 6 à 12 heures sans prise alimentaire, alors que d'autres auteurs prolongent la surveillance et les analyses biologiques

pendant 16 [122] voire 24 heures [118]. Dans ce dernier cas, la reprise d'une alimentation est autorisée, ce qui complique l'interprétation du profil des lipoprotéines postprandiales.

- **Choix des paramètres et des temps d'exploration dans l'interprétation du métabolisme lipidique postprandial**

Les paramètres lipidiques postprandiaux les plus discriminants pour différencier une population contrôle d'une population pathologique sont les triglycérides, le palmitate de rétinol et l'apo B48. Les temps les plus discriminants sont le pic lipidique [234], l'aire sous la courbe (ASC) des paramètres analysés [212,241] et les temps tardifs d'élimination des lipides [24,51,177,210]. D'une manière générale, l'évolution des triglycérides plasmatiques, mais également des sous-fractions lipidiques contenant des triglycérides, obéit à une réponse biphasique. La première partie de la courbe d'une durée variable de 3 à 6 heures correspond principalement à la digestion, l'absorption et la synthèse des triglycérides d'origine intestinale. La seconde partie, elle aussi de durée variable, correspond au catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Ainsi, la détermination des paramètres lipidiques postprandiaux les plus discriminants, réalisée avant la charge lipidique, au pic et à la fin de l'épreuve, peut éventuellement suffire à caractériser la lipémie postprandiale d'un sujet.

## **2 - Présentation de l'étude**

Le but de notre travail est donc de vérifier si la réduction à 3 temps d'analyse (T0, T4 (pic des triglycérides) et T8 heures) des paramètres lipidiques discriminants, donne une information comparable à l'étude cinétique complète (5 à 12 prélèvements) dans des populations témoins et pathologiques.

Dans une étude post-hoc, nous avons regroupé les données de 3 travaux déjà publiés, et réanalysé les résultats en utilisant les temps mentionnés ci-dessus (T0, T4 et T8). Ces analyses ont été conduites chez des témoins sains comparés à des obèses non diabétiques [97], des diabétiques de type 2 normolipidémiques [69], et des diabétiques de type 2 hyperlipidémiques avant et après instauration d'un traitement hypolipémiant [13]. Au total, les paramètres lipidiques postprandiaux de 87 sujets ont été réanalysés.

Les variables étudiées étaient les suivantes :

- Horaires des pics lipidiques postprandiaux
- Aires sous la courbe conventionnelle (5 ou 7 points de cinétique) des paramètres lipidiques postprandiaux
- Aires sous la courbe simplifiée à partir des trois points de cinétique postprandiale (T0, T4 et T8).

### **3 - Résultats de l'étude**

- Le temps moyen d'apparition du pic de triglycérides pour l'ensemble des 87 sujets étudiés se situe entre 4,34 et 4,49 heures, selon la fraction lipidique analysée (plasma, chylomicron et non chylomicron).
- Ce résultat confirme les données de la littérature sur les cinétiques postprandiales de triglycérides [47,129].
- Les deux modèles d'aires sous la courbe sont significativement corrélés quel que soit le paramètre lipidique analysé (triglycérides ou palmitate de rétinol) et quelle que soit la fraction lipidique étudiée (plasma, chylomicrons, ou non-chylomicrons)( $r = 0,868 - 0,995$ ,  $p < 0,0001$ ).

- Dans chacune des 3 études réanalysées, les différences initialement relevées avec la méthode classique sont également observées avec la méthode simplifiée.
- La méthode simplifiée n'est pas applicable pour des groupes de sujets dont le nombre est limité (< à 10 sujets).
- En appliquant la méthode de calcul des moyennes de différence de Bland & Altman pour comparer deux méthodes biologiques [27], nous avons déterminé si l'appréciation du métabolisme lipidique postprandial par la méthode simplifiée sous-estimait ou sur-estimait la valeur donnée par les aires sous la courbe conventionnelles.
- La moyenne des différences est très faible et proche de zéro, suggérant que les deux modèles explorent la même cinétique postprandiale, et que ces différences sont négligeables pour l'interprétation des cinétiques de lipémie postprandiale. Cette moyenne des différences est de 0,34 - 0,74 mmol/L.h pour les triglycérides selon la fraction lipidique étudiée, et de -0,05 à 0,17 mg/L.h pour le palmitate de rétinol.

#### **4 - Discussion des résultats**

- Ce modèle de simplification des épreuves lipidiques semble s'appliquer aux triglycérides plasmatiques et aux triglycérides des fractions chylomicrons et non-chylomicrons. Pour les triglycérides, la perte d'information liée à l'application du modèle simplifié est négligeable.
- En revanche, la cinétique particulière du palmitate de rétinol (utilisé comme traceur vitaminique des lipoprotéines intestinales) s'intègre mal dans le modèle de 3 prélèvements seulement. Plusieurs explications à ce phénomène :



- 1) les concentrations de palmitate de rétinol sont souvent décalées dans le temps comparativement à celles des triglycérides [139] pour des raisons de lipolyse des triglycérides et de recirculation des esters de rétinol.
  - 2) Certains patients présentent plusieurs pics de palmitate de rétinol qui rendent inapplicable un modèle simplifié en 3 points d'aire sous la courbe [49].
  - 3) Enfin, les coefficients de variation du palmitate de rétinol sont plus élevés que ceux des triglycérides, élément analytique supplémentaire défavorable à l'application du modèle simplifié à ce paramètre.
- Les valeurs aberrantes du modèle de Bland & Altman se situent en dehors de l'intervalle représenté par la moyenne  $\pm$  2 déviations standard, et correspondent à des patients qui selon nos critères actuels n'auraient pas dû bénéficier d'une exploration lipidique postprandiale. Les critères cliniques et/ou biologiques de ces patients à jeun étaient préalablement pathologiques (obésité morbide, triglycérides > 4 g/l avant l'épreuve lipidique).

## 5 - Conclusions

Notre modèle simplifié apparaît aussi discriminant qu'un modèle classique d'étude de la lipémie postprandiale en ce qui concerne les triglycérides qui demeurent l'un des critères majeurs d'analyse de la lipémie postprandiale dans le plasma et les sous-fractions lipidiques.

Ce modèle pourrait permettre à terme de simplifier et d'élargir le champ d'investigation sur des patients à risque cardiovasculaire ou à risque d'altérations lipidiques postprandiales. Il est applicable à de larges cohortes dans le cadre d'études d'observation ou d'intervention.

En outre, en limitant le nombre de prélèvements, la diversité des types d'analyses est rendue possible, alors qu'un nombre élevé de prélèvements sanguins aboutit à des prises de quantités de sang de plus de 250 ml, et à un coût élevé d'analyses biologiques. Les avantages de cette approche simplifiée sont donc multiples, même si ces résultats très préliminaires demandent à être confirmés.

### **Troisième Partie :**

## **Travaux en cours, perspectives et conclusions**

## I - Synthèse des travaux réalisés

En se fondant sur les travaux publiés, nous pouvons analyser le métabolisme lipidique postprandial de la façon suivante :

1. L'élaboration du repas lipidique test constitue un élément déterminant de l'étude du métabolisme lipidique postprandial. Notre charge en lipides, après plusieurs adaptations nutritionnelles nécessaires, permet d'étudier de façon satisfaisante des sujets susceptibles de présenter des altérations du métabolisme lipidique postprandial.
2. L'application des repas lipidiques tests en période nocturne apparaît validée chez des sujets sains, permettant ainsi de respecter le rythme nyctéméral de prise alimentaire. Ce concept pourrait être à terme proposé comme une alternative aux épreuves diurnes plus contraignantes et éloignées de la physiologie nutritionnelle et métabolique [99,190,248]. Il demande à être testé et validé chez des patients présentant des maladies métaboliques et/ou cardiovasculaires.
3. A la lecture de nos résultats, l'analyse de la lipémie postprandiale chez des sujets normolipidémiques permet de mettre en évidence des altérations lipidiques postprandiales, non suspectées sur la seule analyse du bilan lipidique à jeun.
4. Sur le plan physiopathologique, le recrutement de patients obèses et de témoins normolipidémiques a été déterminant. Ainsi, la persistance d'une triglycéridémie postprandiale élevée chez les obèses androïdes normolipidémiques apparaît liée à une compétition pendant la période postprandiale entre les lipoprotéines exogènes et endogènes, qui se traduit par une accumulation de lipoprotéines d'origine hépatique.

5. En s'appuyant sur ce test dynamique de charge lipidique, nous avons démontré le rôle accessoire tenu par les lipides d'origine alimentaire dans la régulation à court terme du métabolisme de la leptine au cours de l'obésité. Indirectement, nos résultats plaident en faveur de variations nycthémérales de la leptine liées à l'accumulation des prises alimentaires successives de la journée, plutôt qu'en faveur d'une régulation hormonale spécifique.
6. La nécessité d'études sur de larges cohortes pour valider les altérations lipidiques postprandiales comme marqueur et facteur de risque cardiovasculaire, impose à terme une simplification de ces analyses dynamiques. Notre modèle en 3 points d'analyse cinétique constitue un début de réponse à la lourdeur méthodologique et au coût élevé des analyses postprandiales classiques. Ce souci de simplification et de standardisation demeure cependant un sujet de polémique et de discussion [127].

## **II - Avenir de l'exploration lipidique postprandiale**

Deux aspects de l'étude du métabolisme lipidique postprandial nous semble devoir être développés :

1. Proposer des études épidémiologiques d'observation ou d'intervention dans le domaine cardiovasculaire. Pour ce faire, l'utilisation d'un test simplifié, avec une charge en lipides standardisée, et une période d'analyse diurne ou nocturne qui reste à définir, permettrait de confirmer le rôle pronostique des altérations lipidiques postprandiales dans la genèse de l'athérosclérose sur de larges cohortes.

2. Poursuivre l'analyse physiopathologique afin de déterminer les mécanismes qui rendent compte du rôle pathogène des lipides postprandiaux. Cette approche justifie, à l'opposé de la première, de maintenir une méthodologie lourde de prélèvements et d'analyses biochimiques, cellulaires et génétiques, mais réservée à des cohortes limitées et ciblées de patients.

### **III - Travaux en cours : études d'observation et d'intervention dans le domaine cardiovasculaire**

Nos travaux portent sur la recherche de relations entre les lipoprotéines plasmatiques à jeun et postprandiales, et certains organes cibles comme la cellule endothéliale et le tissu adipeux. L'objectif est de mettre en évidence l'influence des lipides à jeun et postprandiaux sur la structure et/ou la fonction de ces modèles cellulaires.

#### **A - Etude d'observation**

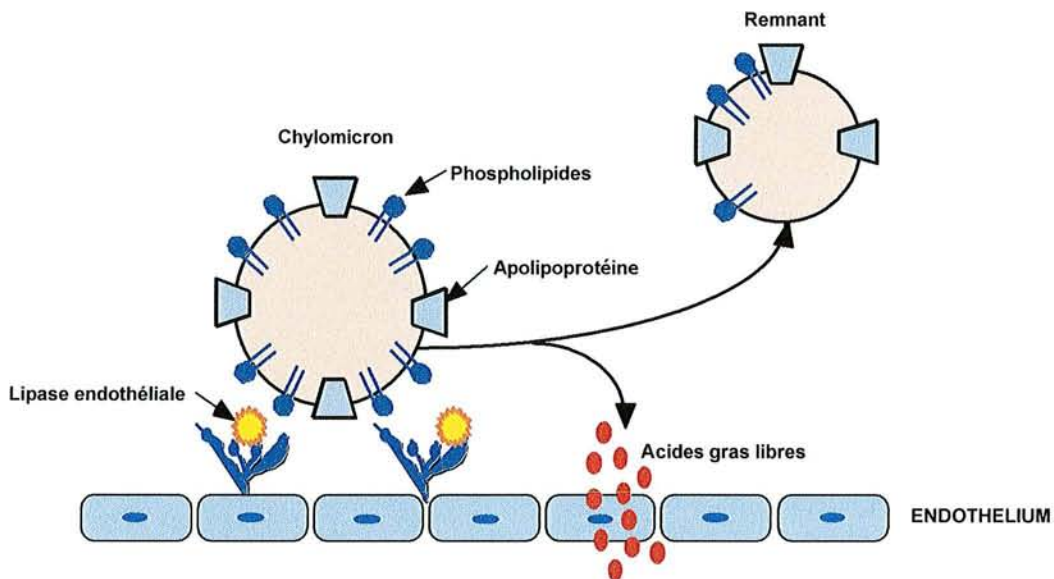
##### **1 - Argumentaire**

L'altération fonctionnelle de la cellule endothéliale joue un rôle primordial dans la phase précoce du développement de l'athérosclérose. Plusieurs études ont démontré le rôle délétère de concentrations élevées de cholestérol total et de cholestérol-LDL vis à vis de l'intégrité fonctionnelle de la cellule endothéliale [216,250]. Cet effet serait en partie lié au stress oxydatif, et en particulier au processus d'oxydation des LDL [34,119,150].

Bien que l'hypertriglycéridémie soit reconnue comme un facteur de risque indépendant de coronaropathie, les données concernant l'influence des triglycérides sur la fonction endothéliale restent controversées, en particulier dans les études comparant des patients coronariens à des sujets témoins [60,96]. Certains travaux démontrent pourtant l'existence de variations postprandiales de la vasorelaxation endothéliale, sous l'action d'une charge orale en lipides administrée à des sujets normolipidémiques [172,181,237]. La responsabilité de telle ou telle lipoprotéine reste débattue, mais des travaux *in vitro* suggèrent que les remnants de lipoprotéines riches en triglycérides (CM et VLDL) sont impliqués dans ces variations postprandiales de la fonction endothéliale [64]. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus chez des diabétiques de type 2, dont la diminution de réactivité dépendante de l'endothélium est liée à l'enrichissement en triglycérides des VLDL et des LDL en période postprandiale [7].

Le rôle toxique des acides gras libres sur la cellule endothéliale constitue une piste physiopathologique nouvelle (**Figure 12**). Libérés à partir des phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides sous l'action de la lipase endothéliale [182], les acides gras inhibent l'action de la NO synthase endothéliale, limitant ainsi la production du monoxyde d'azote, principal facteur vasorelaxant de l'endothélium [218]. Ils augmentent la perméabilité membranaire et favorisent probablement l'apoptose de la cellule endothéliale [55]. L'insulinorésistance est considérée par certains comme le dénominateur commun à ces altérations de la fonction endothéliale et aux facteurs lipidiques impliqués dans ces anomalies de la paroi vasculaire [180,217].

**Figure 12 :  
Lipase endothé debate et lipoprotéines riches en triglycérides**



## 2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires

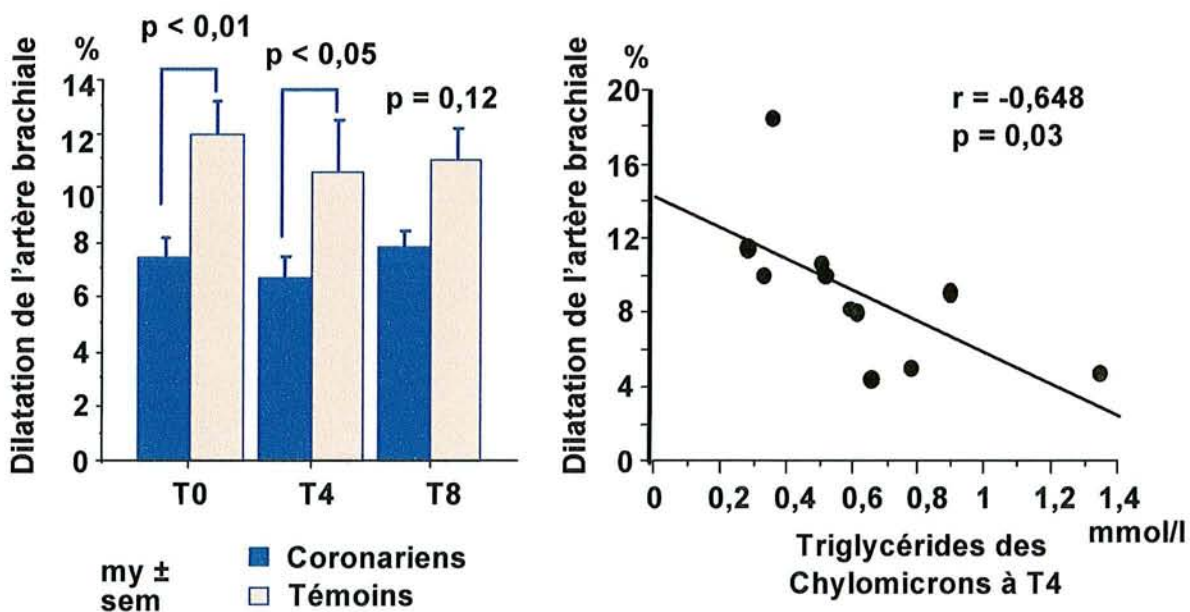
- Ce travail étudie la réactivité de l'endothélium à une charge orale en lipides chez des coronariens ( $n = 6$ ) comparés à sujets sains ( $n = 7$ ) (étude LIPENCO). La méthodologie de cette étude consiste à évaluer sur une période de 8 heures, conjointement aux paramètres lipidiques postprandiaux, la vasodilatation de l'endothélium au début de l'épreuve d'hyperlipémie provoquée, au pic de triglycérides (T 4 heures), et à la fin de l'épreuve (T 8 heures). La vasodilatation liée à l'endothélium est évaluée à la suite d'un test d'ischémie-hyperhémie de l'artère brachiale. L'augmentation du flux sanguin et les forces de cisaillement qui y sont associées stimulent la production de substances vasorelaxantes, et par conséquent l'augmentation du diamètre de l'artère brachiale. Cette variation du diamètre de l'artère brachiale évaluée en écho-doppler, et mesurée dans les 4 à 5 minutes



suivant la phase d'ischémie-hyperhémie, détermine le niveau de vasodilatation dépendante de l'endothélium.

- Nous avons mis en évidence des altérations de la fonction endothélium-dépendante chez les patients coronariens normolipidémiques comparés aux témoins. Les patients coronariens présentent une moindre vasodilatation de l'artère brachiale au repos, anomalie qui persiste après l'absorption d'une charge orale en lipides. En analyse univariée, les triglycérides de la fraction chylomicron, au pic de la lipémie postprandiale, sont associés significativement aux altérations de la fonction endothéliale (**Figure 13**). Une analyse complémentaire semble montrer que les acides gras libres seraient également associés aux altérations fonctionnelles de la cellule endothéliale. Sur la base de ces résultats préliminaires, un effet délétère aigu des lipides postprandiaux sur la cellule endothéliale n'est pas à exclure.

**Figure 13 :**  
**Vasodilatation artérielle endothélium-dépendante**  
**(après ischémie)**



## **B - Etude d'intervention**

### **1 - Argumentaire**

L'effet bénéfique sur la dysfonction endothéliale des traitements hypocholestérolémiants, par statine en particulier, a été mis en évidence pour des concentrations initiales de cholestérol plasmatique hautes ou modérément augmentées [151]. Plus récemment, le traitement par fibrates chez le patient diabétique de type 2 dyslipidémique, est associé à une amélioration du profil lipidique postprandial, mais aussi à une amélioration de la fonction endothéliale à jeun comme en période postprandiale [73]. Par contre, on ne dispose d'aucune étude prospective comparant les effets de différents traitements hypolipémiants sur les paramètres lipidiques et la vasorégulation endothéliale.

### **2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires**

L'étude que nous mettons actuellement en place a pour but de comparer l'efficacité d'un traitement par fibrate comparé à un traitement par statine sur la fonction endothéliale et les réponses lipidiques avant et après charge orale en lipides (Etude C FEN). Le recrutement concerne 40 sujets de sexe masculin, âgés de 40 à 65 ans, ne présentant ni obésité, ni trouble du métabolisme du glucose, et dont les caractéristiques de bilan lipidique sont les suivantes :

- triglycérides entre 1,50 et 3,50 g/l
- cholestérol total entre 2,00 et 3,00 g/l
- cholestérol-LDL entre 1,00 et 1,90 g/l.

Après randomisation, 20 sujets seront traités par fibrate, les 20 autres par statine.

- Le critère principal de jugement est de comparer l'action respective de chacun des deux traitements hypolipémiants sur la fonction endothéliale chez ces patients dyslipidémiques avant et après une charge orale en lipides.

- L'objectif secondaire est de démontrer qu'il existe une relation entre la vasoréactivité flux (endothélium)-dépendante de l'artère brachiale et les paramètres lipidiques postprandiaux, avant et 3 mois après la mise en route du traitement hypolipémiant.

La mise en place récente de cette étude d'intervention thérapeutique ne permet pas de présenter des résultats.

## **IV - Travaux en cours dans le domaine physiopathologique**

### **A - Lipémie postprandiale et efflux de cholestérol**

#### **1 - Argumentaire**

Le rôle du tissu adipeux ne se limite pas à un simple stockage de triglycérides. Son activité est complexe avec la sécrétion d'enzymes et de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique. La présence d'une obésité, et plus particulièrement d'une obésité androïde, se traduit par une baisse de la concentration de cholestérol-HDL dont les mécanismes physiopathologiques restent encore obscurs. Les concentrations, mais aussi la composition des HDL, peut être dépendante de la synthèse de protéines adipocytaires, telles que la CETP et la PLTP, cette dernière étant cependant de distribution très ubiquitaire. Cette composition lipidique des lipoprotéines plasmatiques est au moins aussi importante que leurs seules concentrations plasmatiques.

- HDL et maladies cardiovasculaires

Le rôle protecteur des HDL est bien documenté par un faisceau d'études épidémiologiques convergentes [2,10]. Un des mécanismes de protection est lié à la capacité d'efflux du cholestérol [75] médiée par les particules HDL [163]. La relation

entre les concentrations plasmatiques de cholestérol-HDL et l'efflux de cholestérol a été mise en évidence *in vitro* [194]. Cependant, aucune étude prospective ne permet de confirmer cette relation.

- HDL et transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol permet le retour du cholestérol cellulaire en excès vers le foie. Il fait intervenir les protéines constitutives des HDL, l'apo A-I, l'apo A-II, l'apo E, l'apo A-IV, des protéines de transfert et enzymes telles que la CETP, la PLTP, la LCAT, les lipases lipoprotéine lipase et triglycéride lipase hépatique. Ce transport inverse du cholestérol peut être divisé en quatre étapes principales. L'efflux du cholestérol cellulaire est la première étape de la voie de retour du cholestérol vers le foie. Trois mécanismes sont proposés pour cette étape: 1) la désorption du cholestérol cellulaire et sa diffusion aqueuse vers les HDL, 2) la microsolubilisation de la membrane vers des apoprotéines dépourvues ou appauvries en lipides, les pré $\beta$ 1-HDL, 3) l'efflux de cholestérol cellulaire par le récepteur SR-BI (scavenger receptor-BI). La composition lipidique des HDL, et en particulier la concentration en phospholipides (PL), influence fortement la capacité d'efflux de cholestérol [77]. Cette concentration en phospholipides des HDL permet de prédire 50 p. 100 de la variance de la capacité d'un sérum à accepter le cholestérol cellulaire. L'estérification sur les HDL du cholestérol libre issu des cellules (rôle de la LCAT), ainsi que le transfert de ce cholestérol assuré par la CETP vers les autres lipoprotéines, constituent également des éléments déterminants dans la régulation du transport inverse du cholestérol. Le cholestérol ainsi retourné au foie est ensuite éliminé par voie biliaire.

- HDL et obésité

Les concentrations de cholestérol-HDL, et plus particulièrement celles de HDL2, sont classiquement diminuées au cours de l'obésité [63], mais également chez des sujets dont la sensibilité à l'insuline est réduite [78]. Des altérations dans le transport inverse du cholestérol ont été observées au cours de l'obésité, et peuvent favoriser, au moins en partie, le développement de l'athérosclérose.

- HDL, lipémie postprandiale et efflux cellulaire de cholestérol

Le métabolisme postprandial intervient dans la régulation de l'efflux de cholestérol, suite à l'enrichissement des HDL par les résidus de la lipolyse des chylomicrons en particulier [59,77,200], mais aussi par les échanges amplifiés de constituants lipidiques (esters de cholestérol, phospholipides) entre les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides.

Les patients obèses, qui présentent classiquement des altérations du métabolisme lipidique postprandial [148,234] liées à la répartition androïde du tissu adipeux [51], sont par conséquent susceptibles de présenter un efflux de cholestérol perturbé en période postprandiale. Cette distribution androïde chez les sujets obèses leur confère par ailleurs un risque cardiovasculaire plus élevé comparativement aux sujets dont l'obésité est gynoïde [62].

## **2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires**

Etant donné que la répartition androïde du tissu adipeux de sujets obèses est un puissant déterminant des altérations du métabolisme lipidique à jeun et en période postprandiale [51,159], nous évaluons les répercussions de la distribution androïde de la masse grasse sur l'efflux de cholestérol en période postprandiale chez des femmes obèses comparées à des femmes et à des hommes non obèses. Ce travail est réalisé en collaboration avec l'équipe du Laboratoire de la Fédération

d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies de la Nutrition, Hôpital de l'Antiquaille à Lyon (Madame Delphine Autran, étudiante en Thèse, et Madame Anik Girard-Globa, Directeur de Recherche INSERM).

Notre étude porte sur l'évaluation de la capacité des sérums à promouvoir l'efflux de cholestérol, à partir d'un modèle *in vitro* de cellules d'hépatomes de rats (Fu 5AH). La sélection actuelle de notre population se définit comme telle :

- 13 femmes obèses androïdes définies par un indice de masse corporelle = 30 kg/m<sup>2</sup>, et dont le rapport taille/hanches est > à 0,85
- 25 femmes non obèses
- 26 hommes non obèses.

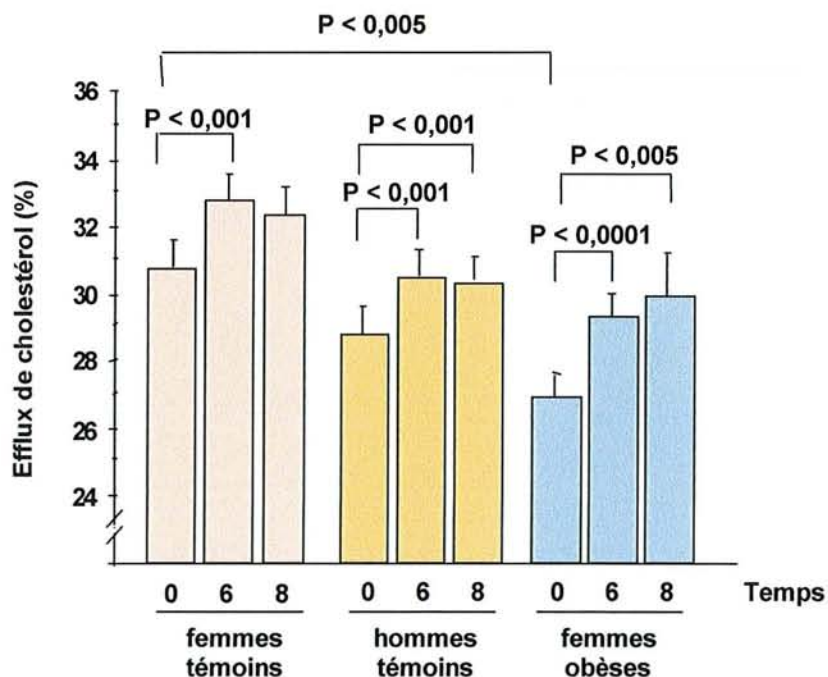
Les variables étudiées sont les suivantes :

- Repas lipidique test (initialement décrit)
- Durée d'analyse postprandiale de 8 heures
- Modèle cellulaire d'efflux décrit par l'équipe de Rothblat *et col.* [194]. Les cellules (FU5AH) d'hépatome de rats sont chargées en cholestérol puis mises en contact avec du sérum ou des HDL isolées. La quantité de cholestérol sortant de ces cellules et prise en charge par les lipoprotéines est alors déterminée. Le cholestérol cellulaire est marqué à l'aide de cholestérol tritié. C'est la quantité de transfert de cholestérol marqué libéré par les cellules sur une durée de 4 heures d'incubation qui détermine la qualité et la quantification de l'efflux. Le résultat est exprimé en pourcentage entre la quantité initiale de cholestérol cellulaire et la quantité libérée à partir de cellules. Le maximum d'efflux postprandial survenant entre la 6ème et la 8ème heure, trois temps de prélèvements seulement (T0, 6 et 8 heures) ont été retenus pour l'ensemble des sujets de l'étude.

Les résultats préliminaires sont les suivants :

- L'efflux de cholestérol est significativement plus faible à jeun chez la femme obèse androïde comparée à la femme non obèse, les hommes non obèses se situant à un niveau intermédiaire.
- La capacité du sérum à permettre l'efflux de cholestérol augmente significativement dans le temps pour les trois groupes, et de façon similaire. Néanmoins, les femmes obèses androïdes se situent toujours à un niveau inférieur en valeur absolue comparativement aux deux groupes de femmes et d'hommes de poids normal (**Figure 14**).
- Ces différences existent en dépit de concentrations de cholestérol-HDL non significativement différentes, et de bilan lipidique non pathologique à jeun.

**Figure 14 :**  
**Efflux de cholestérol à jeun et postprandial chez le sujet obèse**



- En analyse multivariée, on retrouve le rôle prépondérant du cholestérol-HDL comme facteur prédicteur de l'efflux de cholestérol à jeun, expliquant 17,7 p. 100 de la variance de ce paramètre. En postprandial, le rapport taille/hanches, et donc le caractère androïde de l'obésité, et non le simple indice de masse corporelle, est le plus fort prédicteur indépendant de l'efflux de cholestérol postprandial, expliquant 19 p. 100 de la variance de ce paramètre (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Analyse multivariée de la capacité d'efflux de cholestérol des femmes obèses androïdes comparées à des femmes et des hommes de poids normal

Variable dépendante	Variables indépendantes	R <sup>2</sup> %	P
Efflux à jeun	HDL-C	17,7	0,004
	T/H	23,3	0,05
	IMC	—	NS
	HOMA	—	NS
Efflux postprandial (6 heures)	T/H	19	0,003
	HDL-C	25,3	0,05
	IMC	—	NS
	HOMA	—	NS

### Légende

T/H : rapport taille sur hanches, IMC : indice de masse corporelle, HOMA, Homeostasis Model Assessment, NS Non significatif

La répartition androïde de la masse grasse, qui est liée à la diminution de la sensibilité à l'insuline, influence la qualité de l'efflux de cholestérol indépendamment du taux de cholestérol-HDL. Le rôle de certaines protéines de transfert lipidique impliquées dans le métabolisme des HDL, comme la CETP et la PLTP, est évoqué [70,125,215].

Ces résultats sont en accord avec ceux de De la Llera Moya *et col.* [59] et de Sasahara *et col.* [201], ces derniers observant chez des sujets obèses à jeun, une



capacité d'efflux de cholestérol plus faible que chez des témoins. Mais dans cette étude, les facteurs explicatifs étaient l'indice de masse corporelle par l'intermédiaire d'une concentration significativement plus faible de cholestérol-HDL chez les obèses.

## **B - Lipémie postprandiale, composition des HDL et insulino-résistance**

### **1 - Argumentaire**

- Propriétés anti-athérogènes des HDL

Des modifications structurales des HDL peuvent influencer les capacités fonctionnelles de ces lipoprotéines, en particulier celle à assurer le transport inverse du cholestérol de manière satisfaisante, une de leur principale propriété anti-athérogène. *In vitro*, à partir de modèles cellulaires d'hépatome de rat (cellules Fu5AH), la concentration en phospholipides des HDL influence l'efflux de cholestérol et la concentration de phospholipides dans les HDL peut être utilisée comme un élément prédictif de la capacité d'un sérum à accepter le cholestérol cellulaire [77].

- Anomalies de composition des HDL et insulino-résistance

Des anomalies de composition des HDL en particulier en phospholipides ont été décrites dans les situations d'insulino-résistance [228]. Une diminution des phospholipides totaux des HDL2 et HDL3 est également retrouvée au cours du syndrome d'ovaires polykystiques [183], où l'insulino-résistance est un élément classiquement observé. Au cours de l'hypertension artérielle, souvent associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline, les différentes classes de phospholipides des HDL sont diminuées, et le rapport sphingomyéline / phosphatidylcholine est diminué dans les HDL2 et 3 [17].

- Composition des HDL en période postprandiale

En période postprandiale, il est classiquement rapporté une augmentation physiologique des phospholipides totaux, mais le plus souvent à partir de la 12ème heure [148]. Cette augmentation est significative, d'environ 15 à 20 p. 100, et touche principalement la fraction HDL, les autres fractions lipidiques étant beaucoup moins impliquées. Les triglycérides jouent un rôle essentiel dans l'enrichissement postprandial en phospholipides des HDL. Cette relation entre la concentration de triglycérides plasmatiques et la composition en phospholipides des HDL est observée entre la 6ème et la 8ème heure postprandiale. Les triglycérides à jeun sont ainsi prédicteurs de l'évolution de la composition lipidique des HDL en postprandial. Ce transfert de phospholipides des particules riches en triglycérides vers les HDL est lié à l'activité de la PLTP [40]. Cela explique que l'activité enzymatique de cette protéine soit fortement liée au pourcentage d'efflux cellulaire de cholestérol [219].

Au cours de l'obésité, du diabète de type 2, ou chez des patients coronariens, (situations cliniques où prédomine l'insulinorésistance), un retard ainsi qu'une amplitude réduite de l'enrichissement postprandial en phospholipides des HDL a été démontrée [92,148], en particulier dans les sous-fractions HDL2 et HDL3 [69]. Les activités des protéines de transfert lipidique pourraient être impliquées dans ces variations de composition en phospholipides des HDL. Cependant, aucune différence dans l'activité de la CETP n'a été observée entre des patients coronariens et des témoins. Par contre, la PLTP constitue une piste intéressante, son activité étant corrélée au degré de sensibilité à l'insuline évaluée au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinique chez des sujets obèses [188].

## 2 - Présentation de l'étude et résultats préliminaires

Nous évaluons l'impact d'une charge orale en lipides sur la composition des HDL dans une population de 10 femmes obèses androïdes (étude PLAMA). Ce travail est réalisé en association avec le Centre d'Investigation Clinique INSERM-CHU de Nancy et le Laboratoire de Nutrition de la Faculté de Médecine (Professeur Olivier Ziegler - Mireille Donner, Directeur de Recherche INSERM).

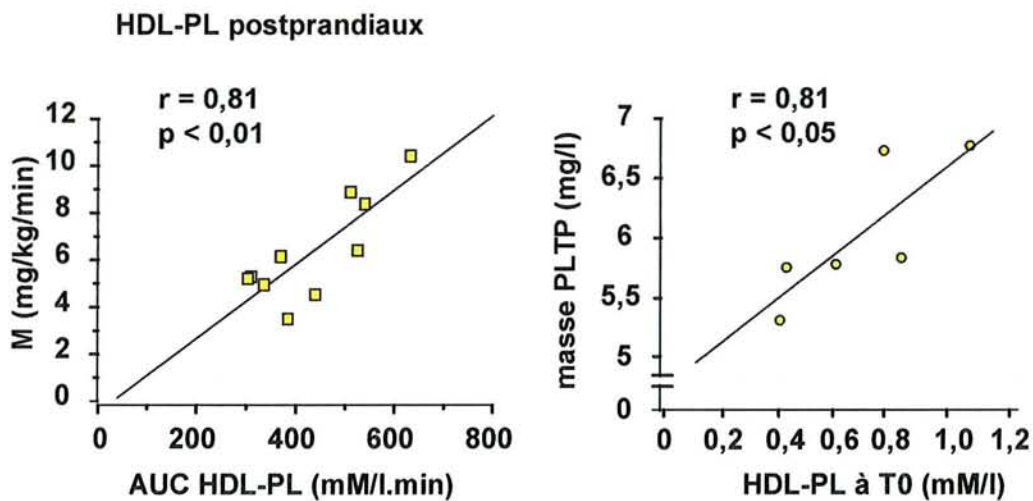
- La charge orale en lipides est identique aux précédents travaux, mais la durée d'analyse est de 10 heures avec 3 prélèvements plasmatiques seulement (T0, T4 et T10 heures).
- La sensibilité à l'insuline des patientes recrutées fait appel à une méthode de clamp euglycémique hyperinsulinique avec un seul plateau d'insulinémie obtenu par une perfusion d'insuline à 2,5 mU/kg/min.
- La séparation des lipoprotéines plasmatiques s'effectue selon une méthode d'ultracentrifugation en gradient de densité de KBr qui permet de séparer les lipoprotéines suivantes : TRL, LDL et HDL. Par contre, elle ne permet pas d'isoler les différentes fractions de lipoprotéines riches en triglycérides. Les tubes sont centrifugés 24 heures à 40.000 rpm. Une seule centrifugation est nécessaire pour isoler ces trois grandes classes de lipoprotéines. Cette option biochimique de séparation des lipoprotéines plasmatiques permet d'isoler principalement les lipoprotéines HDL sans recourir à une ultracentrifugation séquentielle longue et coûteuse, et d'analyser la composition lipidique des HDL en protéines, triglycérides, cholestérol estérifié et libre, et phospholipides.

Les résultats préliminaires de cette étude montrent :

- Les concentrations en phospholipides des HDL varient en période postprandiale.

- Le plateau d'insulinémie obtenu se situe à  $127 \pm 17$  mU/L sur les trente dernières minutes du clamp euglycémique hyperinsulinique, avec une valeur de glucose perfusé estimée à  $6,6 \pm 2,1$  mg/kg/min..
- La concentration en phospholipides des HDL est corrélée au degré de sensibilité à l'insuline. Ainsi, les patientes les plus insulino-résistantes ont l'enrichissement en phospholipides des HDL le plus faible [98] (**Figure 15, gauche**).

Figure 15 :



### Légende

M : quantité de glucose perfusé, AUC : aire sous la courbe, PL : phospholipides, PLTP : Phospholipid Transfer Protein

- Les répercussions fonctionnelles de ces anomalies restent à déterminer, mais on peut supposer qu'elles ont un impact sur les capacités fonctionnelles des HDL, en particulier sur leur capacité de transport inverse du cholestérol. La fonction des HDL dépend également de leur taille, de la richesse en phospholipides des particules et du rapport sphingomyéline/phosphatidyléthanolamine. Tous ces paramètres sont

susceptibles d'être influencés par l'activité de la PLTP, de la CETP et de la lipoprotéine lipase des adipocytes. Des résultats préliminaires obtenus chez 6 de nos 10 patientes obèses androïdes montrent que l'activité de la PLTP serait impliquée dans ces modifications postprandiales de composition des HDL. Plus l'activité enzymatique de cette protéine est élevée, plus les particules HDL s'enrichissent en phospholipides (**Figure 15, droite**).

## **V - Perspectives : études *ex vivo* et *in vitro***

### **1 - Réactivité de la cellule endothéliale en présence de lipoprotéines riches en triglycérides**

La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui amènent au développement de l'athérosclérose est une étape essentielle à la prise en charge adaptée et efficace de patients à risque vasculaire, mais aussi à terme à la prévention de la maladie.

Nous avons vu que les altérations de la fonction endothéliale apparaissent très précocément, en l'absence d'atteinte authentifiée sur le plan coronaire [168], et au sein de populations reconnues à risque sur le plan métabolique et/ou cardiovasculaire. Il s'agit en particulier de toutes les situations qui sont liées à une diminution de la sensibilité à l'insuline, telles que le diabète, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle. Une étude *in vitro* avait suggéré le rôle des remnants de lipoprotéines riches en triglycérides dans les altérations fonctionnelles de la cellule endothéliale [64], et récemment, *in vivo* chez des diabétiques de type 2, la responsabilité des VLDL dans ces anomalies de la vasorégulation endothéliale a été évoquée [7,74].

En complément de l'étude *in vivo* actuellement en cours de réalisation (étude LIPENCO), nous développons une approche fondamentale afin de déterminer l'impact des particules riches en triglycérides sur la fonction endothéliale. A partir de modèles cellulaires de type HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*), notre projet a pour but d'apprécier l'impact cellulaire de ces lipoprotéines sur la production des substances vasoactives de l'endothélium (monoxyde d'azote, prostacycline et endothéline) et sur les facteurs de régulation de l'expression du gène de la préproendothéline 1. Dans cette approche cellulaire, plusieurs candidats pathogènes sont proposés : les VLDL, les acides gras libres, et plus spécifiquement ceux provenant de la lipolyse des phospholipides par la lipase endothéliale.

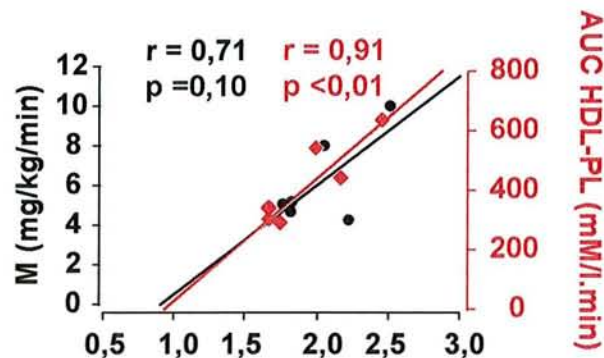
## **2 - Echanges lipidiques entre les lipoprotéines plasmatiques et les cellules adipocytaire et érythrocytaire**

La composition lipidique des lipoprotéines pourrait influencer celle des membranes cellulaires. Nos travaux s'intéressent aux relations entre la composition en phospholipides des HDL, et celle des globules rouges et des adipocytes. Au cours d'une étude pilote, nous avons extrait et isolé des globules rouges par prélèvement sanguin, et des cellules adipocytaires par biopsie de tissu adipeux, afin d'analyser la composition membranaire de ces cellules, issues d'une population de femmes obèses androïdes insulino-résistantes.

Les résultats préliminaires de cette étude *ex vivo* nous amènent à penser qu'il existe des échanges lipidiques entre le plasma et la membrane cellulaire des globules rouges en particulier. L'enrichissement postprandial des HDL en phospholipides est corrélé à la composition phospholipidique des membranes de globules rouges. Ce phénomène pourrait être sous le contrôle de l'insuline, comme

en témoigne la relation inverse entre la sensibilité à l'insuline et la composition phospholipidique des membranes de globules rouges (**Figure 16**).

**Figure 16 :**



#### Légende

M : quantité de glucose perfusé, PE : phosphatidyléthanolamine, SM : sphingomyéline, AUC : aire sous la courbe, PL : phospholipides.

Les mécanismes de ces relations demandent à être élucidés, mais des travaux antérieurs avaient permis à notre équipe de démontrer sur deux modèles cellulaires (globule rouge et adipocyte) une relation entre la composition en phospholipides des membranes cellulaires et le degré d'insulinorésistance des sujets étudiés [38,249]. La composition en sphingomyéline de la membrane du globule rouge expliquait 22% de la variance de l'insulinémie plasmatique. Au niveau adipocytaire, cette même sphingomyéline membranaire rendait compte de près de 48,9% de la variance de l'insulinémie, et de 43,2% de la variance du HOMA. Le rôle des lipides plasmatiques dans ces altérations membranaires est donc séduisant. Le transfert de phospholipides marqués au C14 des particules lipidiques (LDL et HDL) vers des plaquettes humaines a déjà été rapporté par d'autres équipes [72]. Ces données permettent d'imaginer un lien entre les altérations de la lipémie postprandiale, les

modifications de composition des lipoprotéines (en particulier en phospholipides des HDL), les modifications de composition membranaire et le degré de sensibilité à l'insuline.

## **VI - Conclusions générales**

Les dernières études conduites dans le domaine de l'épuration lipidique postprandiale ont permis d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques reliant les lipides postprandiaux et l'athérosclérose. Le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine hépatique est largement incriminé. Le rôle central de l'insuline, et en particulier l'implication des phénomènes d'insulinorésistance jouent une part prépondérante dans ces anomalies lipidiques postprandiales. Des efforts doivent encore être réalisés afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui relient les altérations du métabolisme lipidique postprandial et le risque de développement de maladies cardiovasculaires.

La réflexion doit également nécessairement évoluer vers un processus de standardisation des épreuves lipidiques et donc vers une simplification de leur réalisation pratique, pour autant que l'on reconnaisse leur intérêt en terme de dépistage de sujets à risque de maladies cardiovasculaires. Le choix de populations cibles susceptibles de bénéficier d'une telle évaluation reste à préciser, mais d'ores et déjà, il apparaît superflu de proposer ces épreuves de charge orale en lipides à des sujets suspects de défaut d'épuration lipidique sur leurs simples paramètres lipidiques mesurés à jeun. Les apparentés et/ou collatéraux de sujets obèses, diabétiques de type 2 ou coronariens constituent probablement une cible intéressante.



Il convient également de déterminer la place de la prescription diététique et pharmacologique dans ces altérations postprandiales, et en particulier leur efficacité en terme de contrôle de la morbi-mortalité cardiovasculaire.

Une fois ces conditions réunies, l'analyse du métabolisme lipidique postprandial prendra toute sa valeur en tant qu'élément du diagnostic, voire du pronostic de risque de développement des maladies cardiovasculaires.

## **Quatrième Partie : Bibliographie**

1. La prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique. AFSSAPS, 2000.
2. Abbott RD, Wilson PW, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infraction. The Framingham study. *Arteriosclerosis*, 1988, 8, 207-211.
3. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, et al. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18, 723-731.
4. Agrenn JJ, Hänninen O, Julkunen A, et al. Fish diet, fish oil and docosahexaenoic acid rich oil lower fasting and postprandial plasma lipid levels. *Eur J Clin Nutr*, 1996, 50, 765-771.
5. Aldred HE, Perry IC, Hardman AE. The effect of a single bout of brisk walking on postprandial lipemia in normolipidemic young adults. *Metabolism*, 1994, 43, 836-841.
6. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 1974, 20, 470-475.
7. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2000, 154, 475-483.
8. Annuzzi G, Holmquist L, Carlson LA. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III, E and lipids in serum and serum lipoproteins of normal subjects during alimentary lipaemia. *Scand J Clin Lab Invest*, 1989, 49, 73-81.
9. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective cardiovascular munster study. *Am J Cardiol*, 1992, 70, 733-737.

10. Assmann G, Schulte H, Von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 1996, 124, S11-S20.
11. Atger V, Malon D, Bertière MC, N'Diaye F, Girard-Globa A. Cholesterol distribution between high-density-subfractions HDL2 and HDL3 determined in serum by discontinuous gradient gel electrophoresis. *Clin Chem*, 1991, 37, 1149-1152.
12. Attia N, Durlach V, Paul JL, Soni T, Betoulle D, Girard-Globa A. Modulations of low density lipoprotein subclasses by alimentary lipemia in control and normotriglyceridemic non-insulin dependent diabetic subjects. *Atherosclerosis*, 1995, 113, 197-209.
13. Attia N, Durlach V, Roche D, et al. Post-prandial metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin-dependent diabetic patients before and after bezafibrate treatment. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27, 55-63.
14. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infraction. *J Am Med Assoc*, 1988, 260, 1917-1921.
15. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*, 1998, 81, 7B-12B.
16. Austin MA, Krauss RM. Genetic control of low density lipoprotein subclasses. *Lancet*, 1986, 2, 592-595.
17. Bagdade JD, Buchanan WF, Pollare T, Lithell H. Abnormal lipoprotein phospholipid composition in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis*, 1995, 117, 209-215.

18. Baggio G, Fellin R, Baiocchi MR, et al. Relationship between triglyceride-rich lipoprotein (chylomicrons and VLDL) and HDL and HDL in the post-prandial phase in humans. *Atherosclerosis*, 1980, 37, 271-276.
19. Beaumont JL, Assadolahi F. Retinyl palmitate labeled intestinally derived lipoproteins accumulate in the circulation of WHL rabbits. *Atherosclerosis*, 1990, 85, 103-111.
20. Bergeron N, Havel RJ. Influence of diets rich in saturated and omega-6 polyunsaturated fatty acids on the postprandial responses of apolipoproteins B-48, B-100, E and lipids in triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 2111-2121.
21. Bergeron N, Havel RJ. Prolonged postprandial responses of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing an apolipoprotein e4 allele. *J Clin Invest*, 1996, 97, 65-72.
22. Bergman RD, Finegood DT, Ader M. Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endo Rev*, 1985, 6, 45-86.
23. Berr F, Kern F. Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. *J Lipid Res*, 1984, 25, 805-812.
24. Binnert C, Pachiardi C, Beylot M, et al. Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium-chain triacylglycerols. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67, 595-601.
25. Björkegren J, Hamsten A, Milne RW, Karpe F. Alterations of VLDL composition during alimentary lipemia. *J Lipid Res*, 1997, 38, 301-314.

26. Björkegren J, Packard CJ, Hamsten A, et al. Accumulation of large very low density lipoprotein in plasma during intravenous infusion of a chylomicron-like triglyceride emulsion reflects competition for a common lipolytic pathway. *J Lipid Res*, 1996, 37, 76-86.
27. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986, 1, 307-310.
28. Bloom B, Chaikoff IL, Reinhardt WO. Intestinal lymph as pathway for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths. *Am J Physiol*, 1951, 166, 451-455.
29. Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M. Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest*, 1997, 100, 1107-1113.
30. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 3419-3423.
31. Boquist S, Hamsten A, Karpe F, Ruotolo G. Insulin and non-esterified fatty acid relations to alimentary lipaemia and plasma concentrations of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy middle-aged men. *Diabetologia*, 2000, 43, 185-193.
32. Boquist S, Ruotolo G, Tang R, et al. Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation*, 1999, 100, 723-728.
33. Borel P, Armand M, Pasquier B, et al. Digestion and absorption of tube-feeding emulsions with different droplet sizes and compositions in the rat. *J Parenter Enteral Nutr*, 1994, 18, 534-543.

34. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Cir Res*, 1992, 70, 1191-1197.
35. Brown AJ, Roberts DCK. Moderate fish oil intake improves lipemic response to a standard fat meal. A study in 25 healthy men. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11, 457-466.
36. Brown SA, Chambless LE, Sharrett AR, Gotto AJ, Patsch W. Postprandial lipemia: reliability in an epidemiologic field study. *Am J Epidemiol*, 1992, 136, 538-545.
37. Burnett JR, Barret HR, Vicini P, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin increases the fractional clearance rate of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18, 1906-1914.
38. Candiloros H, Zeghari N, Ziegler O, Donner M, Drouin P. Hyperinsulinemia is related to erythrocyte phospholipid composition and membrane fluidity changes in obese nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 2912-2918.
39. Castro Cabezas M, De Bruin TWA, Kock LAW, et al. Simvastatin improves chylomicron remnant removal in familial combined hyperlipidemia without changing chylomicron conversion. *Metabolism*, 1993, 42, 497-503.
40. Cheung MC, Wolfbauer G, Albers JJ. Plasma phospholipid mass transfer rate: relationship to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1303, 103-110.
41. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RMA, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation*, 1997, 96, 3378-3383.

42. Clavel C, Durlach A, Durlach V, Birembaut P. Rapid and safe determination of human apolipoprotein E genotypes by miniaturised SDS-PAGE in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Pathol*, 1995, 48, 295-299.
43. Cohen JC, Noakes TD, Benade AJS, Spinnler Benade AJ. Serum triglyceride responses to fatty meals: effects of meal fat content. *Am J Clin Nutr*, 1988, 47, 825-827.
44. Cohen JC, Schall R. Reassessing the effects of simple carbohydrates on the serum triglycerides responses to fat meals. *Am J Clin Nutr*, 1988, 48, 1031-1034.
45. Cohn JS. Postprandial lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 1994, 5, 185-190.
46. Cohn JS, Johnson EJ, Millar JS, et al. Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters. *J Lipid Res*, 1993, 34, 2033-2040.
47. Cohn JS, McNamara JR, Cohn SD, Ordovas JM, Schaefer EJ. Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *J Lipid Res*, 1988, 29, 469-479.
48. Cohn JS, McNamara JR, Cohn SD, Ordovas JM, Schaefer EJ. Plasma apolipoprotein changes in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of human subjects fed a fat-rich meal. *J Lipid Res*, 1988, 29, 925-936.
49. Cohn JS, McNamora JR, Krasinski SD, Russell RM, Schaefer EJ. Role of triglyceride-rich lipoprotein from the liver and intestine in the etiology of postprandial peaks in plasma triglyceride concentration. *Metabolism*, 1989, 38, 484-490.
50. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 1996, 334, 292-295.



51. Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, et al. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes*, 1998, 47, 953-960.
52. Curtin A, Deegan P, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Alterations in apolipoprotein B-48 in the postprandial state in NIDDM. *Diabetologia*, 1994, 37, 1259-1264.
53. Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes*, 1996, 45, 695-698.
54. Dallongeville J, Hecquet B, Lebel P, et al. Short term response of circulating leptin to feeding and fasting in man: influence of circadian cycle. *Int J Obes*, 1998, 22, 728-733.
55. Dart AM, Chin-Dusting JPF. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res*, 1999, 43, 308-322.
56. Dart AM, Cooper B. Independent effects of Apo E phenotype and plasma triglyceride on lipoprotein particle in the fasting and postprandial states. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19, 2465-2473.
57. Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension*, 1995, 26, 764-770.
58. De Bruin TWA, Brouwer CB, Gimpel JA, Erkelens DW. Postprandial decrease in HDL cholesterol and HDL apo A-I in normal subjects in relation to triglyceride metabolism. *Am J Physiol*, 1991, 23, E492-E498.
59. De la Llera Moya M, Atger V, Paul JL, et al. A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular efflux: relationships between serum components and efflux, esterification and transfer. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14, 1056-1065.

60. De Man F, Weverling-Rijnsburger A, Van der Laarse A, Smelt A, Jukema J, Blauw G. Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation. Reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20, 744-750.
61. De Ruyter MGM, De Leenheer AP. Simultaneous determination of retinol and retinyl esters in serum or plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Clin Chem*, 1978, 24, 1920-1924.
62. Després JP. Obesity and lipid metabolism: relevance of body fat distribution. *Curr Opin Lipidol*, 1991, 2, 5-15.
63. Després JP. Dyslipidemia and obesity. *Baillière's Clin Endocrinol Metab*, 1994, 8, 629-660.
64. Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, et al. Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis*, 1998, 137, 341-349.
65. Drexler H, Hayoz D, Münzel T, et al. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol*, 1992, 69, 1596-1601.
66. Dua A, Hennes MI, Hoffmann RG, et al. Leptin: a significant indicator of total body fat but not of visceral fat and insulin insensitivity in african-american women. *Diabetes*, 1996, 45, 1635-1637.
67. Dubois C, Beaumier G, Juhel C, et al. Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67, 31-38.
68. Dubois D, Armand M, Mekki N, et al. Effects of increasing amounts of dietary cholesterol on postprandial lipemia and lipoproteins in human subjects. *J Lipid Res*, 1994, 35, 1993-2007.

69. Durlach V, Attia N, Zahouani A, Leutenegger M, Girard-Globa A. Postprandial cholesteryl ester transfer and high density lipoprotein composition in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients. *Atherosclerosis*, 1996, 120, 155-165.
70. Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1500, 88-96.
71. Eliasson B, Mero N, Taskinen MR, Smith U. The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis*, 1997, 129, 79-88.
72. Engelmann B, Kögl C, Kulschar R, Schaipp B. Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. *Biochem J*, 1996, 315, 781-789.
73. Evans M, Anderson RA, Graham J, et al. Ciprofibrate therapy improves endothelial function and reduces postprandial lipemia and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2000, 101, 1773-1779.
74. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20, 2039-2044.
75. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, 36, 211-228.
76. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, 1982, 28, 2077-2080.
77. Fournier N, Paul JL, Atger V, et al. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17, 2685-2691.

78. Frayn KN. Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipid*, 1993, 4, 197-204.
79. Frayn KN. Non-esterified fatty acid metabolism and postprandial lipaemia. *Atherosclerosis*, 1998, 141, 41-46.
80. Fricker J, Giroux S, Fumeron F, Apfelbaum M. Circadian rhythm of energy intake and corpulence status in adults. *Int J Obes*, 1990, 14, 387-393.
81. Friday KE, Srinivasan SR, Elkasabany A, et al. Black-white differences in postprandial triglyceride response and postheparin lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase among young men. *Metabolism*, 1999, 48, 749-754.
82. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson J. Estimation of the concentration of low-density cholesterol in plasma without the use of the preparative ultra-centrifuge. *Clin Chem*, 1972, 18, 499-502.
83. Georgopoulos A, Rosengard AM. Abnormalities in the metabolism of postprandial and fasting triglyceride-rich lipoprotein subfractions in normal and insulin-dependent diabetic subjects: effects of sex. *Metabolism*, 1989, 38, 781-789.
84. Georgopoulos A, Saudek CD. Normalization of composition of triglyceride-rich lipoprotein subfractions in diabetic subjects during insulin infusion with programmable implantable medication system. *Diabetes Care*, 1992, 15, 19-26.
85. Georgopoulos A, Saudek CD. Intraperitoneal insulin delivery decreases the levels of chylomicron remnants in patients with IDDM. *Diabetes Care*, 1994, 17, 1295-1299.
86. Ghaddar HM, Folsom AR, Aleksic N, et al. Correlation of factor VIIa values with factor VII gene polymorphism, fasting and postprandial triglyceride levels, and subclinical carotid atherosclerosis. *Circulation*, 1998, 98, 2815-2821.

87. Gianturco SH, Bradley WA. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects. *Clin Cardiol*, 1999, 22 (Suppl 6), II4-II17.
88. Ginsberg HN, Jones J, Blaner WS, et al. Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate with newly diagnosed exercise-induced myocardial ischemia in middle-aged men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 1829-1838.
89. Girard J. Is leptin the link between obesity and insulin resistance ? *Diabetes Metab*, 1997, 23, 16-24.
90. Goo RH, Moore JG, Greenberg E, Alazraki N. Circadian variation in gastric emptying of meals in humans. *Gastroenterology*, 1987, 93, 515-518.
91. Grant KI, Marais MP, Dhansay MA. Sucrose in a lipid-rich meal amplifies the postprandial excursion of serum and lipoprotein triglyceride and cholesterol concentrations by decreasing triglyceride clearance. *Am J Clin Nutr*, 1994, 59, 853-860.
92. Groener JEM, Scheek LM, Van Ramshorst E, Krauss XH, Van Tol A. Delayed increase in high density lipoprotein-phospholipids after ingestion of a fat load in normolipidemic patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1998, 137, 311-319.
93. Groot PHE, Van Stiphout WAHJ, Krauss XH, et al. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11, 653-662.
94. Grosskopf I, Ringel Y, Charach G, et al. Metformin enhances clearance of chylomicrons and chylomicron remnants in nondiabetic mildly overweight glucose-intolerant subjects. *Diabetes Care*, 1997, 20, 1598-1602.

95. Grundy SM. National Cholesterol Education Program: second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation*, 1994, 89, 1329-1445.
96. Gudmundsson G, Sinkey C, Chenard C, Stumbo P, Haynes W. Resistance vessel endothelial function in healthy humans during transient postprandial hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol*, 2000, 85, 381-385.
97. Guerci B, Vergès B, Durlach V, Hadjadj S, Drouin P, Paul JL. Relationship between altered postprandial lipemia and insulin resistance in normolipidemic and normoglycose tolerant obese patients. *Int J Obes*, 2000, 24, 468-478.
98. Guerci B, Younsi M, Paul JL, Ziegler O, Donner M, Drouin P. Relation entre le degré d'insulino-résistance et l'enrichissement post-prandial en phospholipides des HDL de patientes obèses androïdes. *Ann Endocrinol*, 2000, 61, 392 [Abstract].
99. Hadjadj S, Paul JL, Meyer L, et al. Delayed changes in postprandial lipid in young normolipidemic men after a nocturnal vitamin A oral fat load test. *J Nutr*, 1999, 129, 1649-1655.
100. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the San Antonio heart study. *Diabetes Care*, 1997, 20, 1087-1092.
101. Haffner SM, Mykkänen L, Robbins D, et al. A preponderance of small dense LDL is associated with specific insulin, proinsulin and the components of the insulin resistance syndrome in non-diabetic subjects. *Diabetologia*, 1995, 38, 1328-1336.
102. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 1995, 269, 543-546.
103. Hampton SM, Morgan LM, Lawrence N, et al. Postprandial hormone and metabolic responses in simulated shift work. *J Endocrinol Invest*, 1996, 151, 259-267.

104. Harbis A, Defoort C, Narbonne H, et al. Acute hyperinsulinism modulates plasma apolipoprotein B-48 triglyceride-rich lipoproteins in healthy subjects during the postprandial period. *Diabetes*, 2001, 50, 462-469.
105. Hardman AE. The influence of exercise on postprandial triacylglycerol metabolism. *Arteriosclerosis*, 1998, 141 (suppl 1), S93-S100.
106. Harris M, Galpchian V, Thomas J, Iannotti E, Law T, Rifai N. Three generations of high-density lipoprotein cholesterol assays compared with ultracentrifugation / dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> method. *Clin Chem*, 1997, 43, 816-823.
107. Hartung GH, Foreyt JP, Reeves RS, et al. Effect of alcohol dose on plasma lipoprotein subfractions and lipolytic enzyme activity in active and inactive men. *Metabolism*, 1990, 39, 81-86.
108. Hartung GH, Lawrence SJ, Reeves RS, Foreyt JP. Effect of alcohol and exercise on postprandial lipemia and triglyceride clearance in men. *Atherosclerosis*, 1993, 100, 33-40.
109. Havel PJ, Townsend R, Chaump L, Teff K. High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes*, 1999, 48, 334-341.
110. Havel PJ, Uriu-Hare JY, Stanhope KL, Stern JS, Keen CL, Ahren B. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol*, 1998, 274, R1482-R1491.
111. Havel RJ. Postprandial lipid metabolism: an overview. *Proc Nutr Soc*, 1997, 56, 659-666.
112. Heitzer T, Ylä-Herttuala S, Luoma J, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessel in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*, 1996, 93, 1346-1353.

113. Heller FR, Vandenplas C, Desager JP, Harvengt C. The vitamin A fat-loading test in young normolipidemic subjects. *Clin Chim Acta*, 1993, 219, 167-176.
114. Hixson J, Vernier D. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res*, 1990, 31, 545-548.
115. Hoogerbrugge N, Verkerk A, Jacobs ML, Postema PT, Jongkind JF. Hypertriglyceridemia enhances monocyte binding to endothelial cells in NIDDM. *Diabetes Care*, 1996, 19, 1122-25.
116. Hubert HB, Feinlieb MD, Mc Namara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26 year follow-up of participants in the Framingham study. *Circulation*, 1983, 67, 968-976.
117. Hughes TA, Elam mB, Applegate WB, et al. Postprandial lipoprotein responses in hypertriglyceridemic subjects with and without cardiovascular disease. *Metabolism*, 1995, 44, 1082-1098.
118. Ida Chen YD, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM. Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM ? *Diabetes Care*, 1995, 18, 10-16.
119. Jacobs M, Plane F, Bruckdorfer KR. Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta. *Pharmacol*, 1990, 100, 21-26.
120. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nature Genetics*, 1999, 21, 424-428.
121. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease. An eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation*, 1998, 97, 1029-1036.



122. Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhou MY, et al. Relation between insulin resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma lipoprotein lipase activity, and postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 320-324.
123. Jeppesen J, Ida Chen YD, Zhou MY, Wang T, Reaven GM. Effect of variations in oral fat and carbohydrate load on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62, 1201-1205.
124. Jeppesen J, Zhou MY, Ida Chen YD, Reaven GM. Effect of metformin on postprandial lipemia in patients with fairly to poorly controlled NIDDM. *Diabetes Care*, 1994, 17, 1093-1099.
125. Jiang XC, Moulin P, Quinet E, et al. Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein. *J Biol Chem*, 1991, 266, 4631-4639.
126. Joannic JL, Oppert JM, Lahlou N, et al. Plasma leptin and hunger ratings in healthy humans. *Appetite*, 1998, 30, 129-138.
127. Karpe F. Effects of diet on postprandial lipaemia: a suggestion for methodological standardization. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 1997, 7, 44-55.
128. Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med*, 1999, 246, 341-355.
129. Karpe F, Bell M, Björkegren J, Hamsten A. Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 199-207.
130. Karpe F, Boquist S, Tang T, Bond GM, De Faire U, Hamsten A. Remnants lipoproteins are related to intima-media thickness of the carotid artery independently of LDL cholesterol and plasma triglycerides. *J Lipid Res*, 2001, 42, 17-21.

131. Karpe F, Hellénus ML, Hamsten A. Differences in postprandial concentrations of very-low-density lipoprotein and chylomicron remnants between normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic men with and without coronary heart disease. *Metabolism*, 1999, 48, 301-307.
132. Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, Hamsten A. Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1994, 106, 83-97.
133. Kiens B, Lithell H. Lipoprotein metabolism influenced by training-induced changes in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, 1989, 83, 558.
134. Klein L, Miller TD, Radam TE, O'Brien T, Nguyen TT, Kottke BA. Acute physical exercise alters apolipoprotein E and C-III concentrations of apo E-rich very low density lipoprotein fraction. *Atherosclerosis*, 1992, 97, 37.
135. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans. *Diabetes*, 1996, 45, 1511-1515.
136. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes*, 1996, 45, 699-701.
137. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 4162-4165.
138. Korbonits M, Trainer PJ, Little JA, et al. Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol*, 1997, 46, 751-757.

139. Krasinski SD, Cohn JS, Russell RM, Schaefer EJ. Postprandial plasma vitamin A metabolism in humans: a reassessment of the use of plasma retinyl esters as markers for intestinally derived chylomicrons and their remnants. *Metabolism*, 1990, 39, 357-365.
140. Krasinski SD, Cohn JS, Schaefer EJ, Russell RM. Postprandial plasma retinyl ester response is greater in older subjects compared with younger subjects. *J Clin Invest*, 1990, 85, 883-892.
141. Lahdenperä S, Syväne M, Kahri J, Taskinen MR. Regulation of low-density lipoprotein particle size distribution in NIDDM and coronary disease: importance of serum triglycerides. *Diabetologia*, 1996, 39, 453-461.
142. Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15, 274-282.
143. Lairon D. Dietary fibers: effects on lipid metabolism and mechanisms of action. *Eur J Clin Nutr*, 1996, 50, 125-133.
144. Lairon D. Nutritional and metabolic aspects of postprandial lipemia. *Reprod Nutr Dev*, 1996, 36, 345-355.
145. Lemieux S, Fontani R, Uffelman KD, Lewis GF, Steiner G. Apolipoprotein B-48 and retinyl palmitate are not equivalent markers of postprandial intestinal lipoproteins. *J Lipid Res*, 1998, 39, 1964-1971.
146. Lewis GF, Cabana VG. Postprandial changes in high-density lipoprotein composition and subfraction distribution are not altered in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 1996, 45, 1034-1041.

147. Lewis GF, O'meara NM, Cabanna VG, et al. Postprandial triglyceride response in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is both altered by short-term deterioration in glycaemic control or level of postprandial insulin replacement. *Diabetologia*, 1991, 34, 253-259.
148. Lewis GF, O'meara NM, Soltys PA, et al. Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71, 1041-1050.
149. Lewis GF, O'meara NM, Soltys PA, et al. Fasting hypertriglyceridemia in non insulin-dependent diabetes mellitus is an important predictor of postprandial lipid and lipoprotein abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 72, 834-944.
150. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995, 270, 319-324.
151. Lüscher TF, Tanner FC, Noll G. Lipids and endothelial function: effects of lipid-lowering and other therapeutic interventions. *Curr Opin Lipidol*, 1996, 7, 234-240.
152. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, 1995, 1, 1155-1161.
153. Malmström R, Packard CJ, Caslake M, et al. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1997, 40, 454-462.
154. Malmström R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Järvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*, 1996, 39, 993-996.

155. Mamo JCL. Atherosclerosis as a post-prandial disease. *Endocrinol Metab*, 1995, 2, 229-244.
156. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostatis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985, 28, 412-419.
157. Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royton P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ*, 1990, 300, 230-235.
158. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PWF, Schaefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12, 1284-1290.
159. Mekki N, Christofilis MA, Charbonnier M, et al. Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84, 184-191.
160. Mero N, Syväne M, Eliasson B, Smith U, Taskinen MR. Postprandial elevation of ApoB-48-containing triglyceride-rich particles and retinyl esters in normolipemic males who smoke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17, 2096-2102.
161. Mero N, Tol AV, Scheek LM, et al. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *J Lipid Res*, 1998, 39, 1493-1502.
162. Meyer E, Westerveld HT, De Ruyter-Meijstek FC, et al. Abnormal postprandial apolipoprotein B-48 and triglyceride responses in normolipidemic women with greater than 70% stenotic coronary artery disease: a case-control study. *Atherosclerosis*, 1996, 124, 221-235.

163. Miller NE, Laville A, Crook D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by HDL in rabbit. *Nature*, 1985, 314, 109-111.
164. Mizuno T, Bergen H, Kleopoulos S, Bauman WA, Mobbs CV. Effects of nutritional status and aging on leptin gene expression in mice: importance of glucose. *Horm Metab Res*, 1996, 28, 679-684.
165. Nakajima K, Okazaki M, Tanaka A, et al. Separation and determination of remnant-like particles in human serum using monoclonal antibodies to apo B and apo A-I. *Clin Ligand Assay*, 1996, 19, 177-183.
166. Nikkila M, Solakivi T, Lehtimäki T, Koivula T, Laippala P, Astrom B. Postprandial plasma lipoprotein changes in relation to apolipoprotein E phenotypes and low density lipoprotein size in men with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1994, 106, 149-157.
167. Nikkila M, Pitkäläinen T, Koivula T, et al. Women have a larger and less atherogenic low density lipoprotein particles size than men. *Atherosclerosis*, 1996, 119, 181-190.
168. Nitenberg A, Paycha F, Ledoux S, Sachs R, Attali JR, Valensi P. Coronary artery responses to physiological stimuli are improved by deferoxamine but not by L-Arginine in non-insulin-dependent diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and no other risk factors. *Circulation*, 1998, 97, 736-43.
169. Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 534-542.
170. Nordestgaard BG, Zilversmit DB. Large lipoproteins are excluded from the arterial wall in diabetic cholesterol fed rabbits. *J Lipid Res*, 1988, 29, 1491-1500.

171. O'meara NM, Lewis GF, Cabana VG, Iverius PH, Getz GS, Polonsky KS. Role of basal triglyceride and high density lipoprotein in determination of postprandial lipid and lipoprotein responses. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75, 465-471.
172. Ong P, Dean TS, Hayward CS, Della Monica PLD, Sanders TAB, Collins P. Effect of fat and carbohydrate consumption on endothelial function. *Lancet*, 1999, 354, 2134.
173. Otto C, Pschierer V, Soennichsen AC, Schwandt P, Richter WO. Postprandial hemorrheology and apolipoprotein B metabolism in patients with familial hypertriglyceridemia. *Metabolism*, 1997, 46, 1299-1304.
174. Panarotto D, Maheux P. Reduction of plasma leptin during a short-term fast, an oral glucose tolerance or a meal test can be a misleading bias in clinical studies. *Diabetologia*, 1999, 42, 634.
175. Panza J. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol*, 1997, 20, 26-33.
176. Patsch JR, Karlin JB, Scott LW, Smith LC, Gotto AM. Inverse relationship between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80, 1449-1453.
177. Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, et al. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12, 1336-1345.
178. Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Patsch W. High density lipoprotein<sub>2</sub>: Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Clin Invest*, 1987, 80, 341-347.
179. Pepine CJ. Clinical implications of endothelial dysfunction. *Clin Cardiol*, 1998, 21, 759-799.

180. Pinkney JH, Stehouwer CDA, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 1997, 46, 9-13.
181. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA*, 1997, 278, 1682-1686.
182. Rader DJ, Jaye M. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol*, 2000, 11, 141-147.
183. Rajkhowa M, Neary RH, Kumpatla P, et al. Altered composition of high density lipoproteins in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 3389-3394.
184. Reaven GM, Ida-Chen YD, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density lipoprotein particles. *J Clin Invest*, 1993, 92, 141-146.
185. Redard CL, Davis PA, Schneeman BO. Dietary and gender: effect on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*, 1990, 52, 837-845.
186. Reznik Y, Pousse P, Herrou M, Morello J, Drosowsky MA, Fradin S. Postprandial lipoprotein metabolism in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients: influence of apolipoprotein E polymorphism. *Metabolism*, 1996, 45, 63-71.
187. Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int J Obes*, 1998, 22, 414-423.
188. Riemens SC, Tol AV, Sluiter WJ, Dullaart RPF. Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese type II diabetic patients. *Diabetologia*, 1998, 41, 929-934.



189. Roche HM, Gibney MJ. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk*, 2000, 7, 317-324.
190. Romon M, Le Fur C, Lebel P, Edmé JL, Fruchart JC, Dallongeville J. Circadian variation of postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65, 934-940.
191. Romon M, Lebel P, Velly C, Marecaux N, Fruchart JC, Dallongeville J. Leptin response to carbohydrate or fat meal and association with subsequent satiety and energy intake. *Am J Physiol*, 1999, 277, E855-E861.
192. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 3424-3427.
193. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362, 801-809.
194. Rothblat GH, Phillips MC. Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration. *J Biol Chem*, 1982, 257, 4775-4782.
195. Ryu JE, Craven TE, Mac-Arthur RD, et al. Relationship of intraabdominal fat as measured by magnetic resonance imaging to postprandial lipemia in middle-aged subjects. *Am J Clin Nutr*, 1994, 60, 586-591.
196. Saad MF, Damani S, Gingrich RL, et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 579-584.
197. Saad MF, Khan A, Sharma A, et al. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes*, 1998, 47, 544-549.
198. Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, et al. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 453-459.

199. Sady SP, Thompson PD, Cullinane EM, Kantor MA, Domagala E, Herbert PN. Prolonged exercise augments plasma triglyceride clearance. *J Am Med Assoc*, 1986, 256, 2552.
200. Sakr S, Senault C, Vacher D, Fournier N, Girard-Globa A. Oleic acid-rich fats increase the capacity of postprandial serum to promote cholesterol efflux from Fu5AH cells. *Biophys Biochim Acta*, 1996, 1300, 49-55.
201. Sasahara T, Nestel P, Sviridov D. Cholesterol transport between cells and high density lipoprotein subfractions from obese and lean subjects. *J Lipid Res*, 1998, 39, 544-554.
202. Scheen AJ, Paquot N, Castillo MJ, Lefebvre PJ. How to measure insulin action in vivo. *Diabetes Metab*, 1994, 10, 151-188.
203. Schneeman BO, Kotite L, Todd KM, Havel RJ. Relationship between the responses of triglyceride-rich lipoprotein in blood plasma containing apolipoproteins B-48 and B-100 to fat-containing meal in normolipidemic humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90, 2069-2073.
204. Schoeller DA, Cella LK, Sinha MK, Caro JF. Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest*, 1997, 100, 1882-1887.
205. Schrezenmeir J, Keppler I, Fenselau S, et al. The phenomenon of a high triglyceride response to an oral lipid load in healthy subjects and its link to the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 683, 302-314.
206. Schrezenmeir J, Weber P, Probst R, et al. Postprandial pattern of triglyceride-rich lipoprotein in normal-weight humans after an oral lipid load: exaggerated triglycerides and altered insulin response in some subjects. *Ann Nutr Metab*, 1992, 34, 186-196.

207. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 2000, 101, 1899-1906.
208. Silveira A, Karpe F, Blombäck M, Steiner G, Walldius G, Hamsten A. Activation of coagulation factor VII during alimentary lipemia. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14, 60-69.
209. Simons LA, Dwyer T, Simons J, et al. Chylomicrons and chylomicron remnants in coronary artery disease: a case-control study. *Atherosclerosis*, 1987, 65, 181-189.
210. Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, et al. Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1990, 85, 193-202.
211. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*, 1996, 97, 1344-1347.
212. Slyper AH, Zvereva S, Schectman G, Hoffmann RG, Pleuss J, Walker JA. Normal postprandial lipemia and chylomicron clearance in offspring of parents with early coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 1106-1113.
213. Smith D, Watts GF, Dane-Stewart C, Mamo JCL. Post-prandial chylomicron response may be predicted by a single measurement of plasma apolipoprotein B48 in the fasting state. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29, 204-209.
214. Sparks JD, Sparks CE. Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1990, 15, 8854-8862.
215. Speiger H, Groener JEM, Van Ramshorst E, Van Tol A. Different localisations of CETP and PLTP activities in plasma. *Atherosclerosis*, 1991, 90, 159-168.

216. Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, Johnson A, Cronin J, Baron AD. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation*, 1997, 96, 3287-3293.
217. Steinberg HO, Chaker H, Leaming A, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implication for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*, 1996, 97, 2601-2610.
218. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest*, 1997, 100, 1230-1239.
219. Syväne M, Gastro G, Dengremont C, et al. Cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells induced by plasma of subjects with or without coronary artery disease and non-insulin-dependent diabetes: importance of LpA-I:A-II particles and phospholipid transfer protein. *Arteriosclerosis*, 1996, 127, 245-253.
220. Syväne M, Hilden H, Taskinen MR. Abnormal metabolism of postprandial lipoproteins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus is not related to coronary artery disease. *J Lipid Res*, 1994, 35, 15-26.
221. Syväne M, Talmud PJ, Humphries SE, et al. Determinants of postprandial lipemia in men with coronary artery disease and low levels of HDL cholesterol. *J Lipid Res*, 1997, 38, 1463-1472.
222. Syväne M, Vuorinen-Markkola H, Hilden H, Taskinen MR. Gemfibrozil reduces postprandial lipemia in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13, 286-295.
223. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*, 1996, 94, 1298-1303.

224. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care*, 1994, 17, 152-154.
225. Tall A, Sammett D, Granot E. Mechanisms of enhanced cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins to apolipoprotein B-containing lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest*, 1986, 77, 1163-1172.
226. Tall AR, Blum CB, Forester GP, Nelson CA. Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. *J Biol Chem*, 1982, 257, 198-207.
227. Tangney C, Hafner JM, McQuiston BD, Domas AJ, Rosenson RS. Postprandial changes in plasma and serum viscosity and plasma lipids and lipoproteins after an acute test meal. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65, 36-40.
228. Tilly-Kiesi M, Knudsen P, Groop L, Taskinen MR, Botnia Study Group. Hyperinsulinemia and insulin resistance are associated with multiple abnormalities of lipoprotein subclasses in glucose-tolerant relatives of NIDDM patients. *J Lipid Res*, 1996, 37, 1569-1578.
229. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis*, 1992, 93, 189-199.
230. Uiterwaal CSPM, Grobbee DE, Witteman JCM, et al. Postprandial triglyceride response in young adult men and familial risk for coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med*, 1994, 121, 576-583.
231. Utriainen T, Malmström R, Mäkimattila S, Yki-Järvinen H. Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes*, 1996, 45, 1366-1996.

232. Van Beek AP, De Ruijter-Heijstek FC, Erkelens DW, De Bruin TWA. Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19, 2737-2741.
233. Van Causter E, Desir D, Decoster C, Fery F, Balasse EG. Nocturnal decrease in glucose tolerance during constant glucose infusion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989, 69, 604-611.
234. Vansant G, Mertens A, Muls E. Determinants of postprandial lipemia in obese women. *Int J Obes*, 1999, 23, 14-21.
235. Vidal H, Auboeuf D, De Vos P, et al. The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *J Clin Invest*, 1996, 98, 251-255.
236. Vigna GB, Donega P, Passaro A, et al. Post-prandial effects of gemfibrozil vs simvastatin in hypercholesterolemic subjects with borderline hypertriglyceridemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 1999, 9, 234-243.
237. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effects of single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*, 1997, 79, 350-354.
238. Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci*, 1996, 91, 567-573.
239. Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 561-565.

240. Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Different patterns of postprandial lipoprotein metabolism in normal, type IIa, type III and type IV hyperlipoproteinemic individuals: effect of treatment with cholestyramine and gemfibrozil. *J Clin Invest*, 1987, 79, 1110-1119.
241. Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, et al. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *BMJ*, 1996, 312, 935-939.
242. Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. *J Clin Invest*, 1988, 82, 1884-1893.
243. Westerveld HT, Kock LAW, Van Rijn HJM, Erkelens DW, De Bruin TWA. 17 $\beta$ -estradiol improves postprandial lipid metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80, 249-253.
244. Williams C. Postprandial lipid metabolism : effects of dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc*, 1997, 56, 679-692.
245. Wilson DE, Chan IF, Ball M. Plasma lipoprotein retinoids after vitamin A feeding in normal man: minimal appearance of retinyl esters among low-density lipoproteins. *Metabolism*, 1983, 32, 514-517.
246. Winkler G, Doring A, Keil U. Mealtime patterns in a southern German population. Results from the WHO MONICA 1984/1985 Augsburg nutritional survey project. *Z Ernahrungswiss*, 1995, 34, 2-9.
247. Yen FT, Masson M, Clossais-Bernard N, et al. Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J Biol Chem*, 1999, 274, 13390-13398.

248. Zampelas A, Peel AS, Gould BJ, Wright J, Williams CM. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apolipoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr*, 1994, 48, 842-848.
249. Zeghari N, Younsi M, Meyer L, Donner M, Drouin P, Ziegler O. Adipocyte and erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia: a study in nondiabetic and diabetic obese women. *Int J Obes*, 2000, 24, 1600-1607.
250. Zeiher AM, Drexler H, Saurier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*, 1993, 92, 652-662.
251. Zhang Y, Proenca R, Maffei W, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372, 425-432.
252. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*, 1979, 60, 473-485.



## **Cinquième Partie : Annexes**

## **Annexe 1 : Enveloppe Soleau**

Hubert HASENRADER \*  
Ing. Minus LÉOBEN - ENSPM - C.P.I.  
Gérard DASSAS  
Doct. en Droit de la Propr. Ind. - C.P.I.  
Jean-Jacques JOLY \*  
Ing. ESE - C.P.I.  
Claude ROPITAL-BONVARLET \*  
Ingénieur - C.P.I.  
Gérard PORTAL \*  
Ing. E.S.C.I.L. - C.P.I.  
ASSOCIÉS

Philippe DESCOURTIEUX \*  
Ing. Civ. Gio. Mme - C.P.I.  
CONSULTANT  
158, RUE DE L'UNIVERSITÉ  
F 75340 PARIS CEDEX 07  
TÉL: (1) 44 18 89 00  
TÉLEX: 202401 F (PARIS)  
TÉLÉCOPIEUR: (1) 44 18 04 23  
-CCP 1422 47 X PARIS  
-BNP PARIS MONTMARTRE  
30004 00805 00021044711 70

Evelyne ROUHI  
Maître en Droit - C.P.I.  
Jean Bruno THÉVENET \*  
Ing. ICP - C.P.I.  
Jean-François BLEZUT  
D.E.A. Physique  
Sylvie MANDELBAUM  
DEUG de Droit - C.P.I.  
Marie-Louise GILARD  
Ing. ENSCR - C.P.I.  
Yannick THIÉRY  
D.U.T. Gio. Méca - DESS P.I.  
Martine LE ROUX \*  
Ing. ENSIC - Doct. Ing. - C.P.I.  
Jean-Benoît BUSHÉL \*  
Ing. ENSIC - DESS P.I. - C.P.I.  
Jean-Marc THIBAUT \*  
M.S.T.I. - C.P.I.  
Philippe HUBERT \*  
Ing. ESCIL - C.P.I.  
Jean-Claude HENNON \*  
Ing. H.E.I. - C.P.I.  
Hervé LE BRAS \*  
Ing. ECP - C.P.I.  
Jean Louis SOMMIER \*  
Ing. Civ. Geo. Mme - C.P.I.  
Nathalie REY  
Maître en Droit - DESS P.I. - C.P.I.  
Catherine LE DIASCORN  
Maître en Droit - D.E.A. CP - CAPA - C.P.I.  
Dominic KING \*  
M. Sc. Physique LONDRES - CEPI  
Kenji UCHIDA \*  
Univ. TOKYO - Doct. en Sciences - CEPI  
Annick PARALLAT  
D.E.A. Prop. Lit. Ar. Ing. - C.P.I.  
Eric STERN  
Maître Phys. Chm. - Ing. E.N.S.T.A.  
Pau HERARD  
Ing. ESIL - C.P.I.  
Catherine ULMANN  
Maître Biochimie - DESS Ph. ind. - CEPI  
Guy DRONNE \*  
Ing. E.S.T.P. - C.P.I.  
Françoise GIPAUD \*  
Ing. ENSCP - Doct. Ing. - C.P.I.  
Agnès DAYD  
Ing. E.S.E. - Maître en Droit - DESS P.I.  
Sylvie CAZAUX  
Maître en Droit - DESS P.I. - C.P.I.  
Marc NEVANT  
Ing. E.N.S.C.M. - CEPI  
Franck MATHKOWSKA  
Ing. I.S.E.N. - CEPI  
Raphaël FLEURANCE \*  
M.S.T.I. - CEPI  
Jean-Paul PASOTTI  
Maître en Droit - DESS Droit & Fiscalité - CEPI  
Jean-Michel PIOT  
Maître en Droit - D.E.A. Informatique & Droit  
Didier INTES  
Ing. E.N.S.T.A.  
Aurélia MARIE  
CAPA - DESS Commerce Inter. - DESS P.I. - C.P.I.  
Evelyne ROUX  
Maître en Droit - DESS P.I. - C.P.I.  
Suzanne CRIAN \*  
E.S.C. Physique DUFRAM - Conse. Britannique en Brevets  
Christophe VOUGNY  
D.E.A. Récotique  
Sophie BRAT  
Ing. INSA - CEPI  
Jean-Marc VUILLEMIN  
Ing. Génie Biologique  
Christie et HOURRAT  
Maître en Droit - DESS P.I.



cabinet beau de loménie

CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE, BREVETS, MARQUES ET MODÈLES  
MANDATAIRES AGRÉÉS AUPRÈS DE L'OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

Paris, le 12 Septembre 1996

Professeur Vincent DURLACH  
Clinique Médicale B-U62  
Hôpital Robert-Debré  
Rue Alexis Carrel  
51092 REIMS CEDEX

Vos réf. : -

Nos réf. : 1H245576 cas1FRS/MLG-LK

Dépôt d'une enveloppe Soleau au nom de

### GRUPE DE RECHERCHE ET ETUDES DU METABOLISME POST-PRANDIAL

Cher Monsieur,

Nous faisons suite à vos instructions en date du 14 Août 1996 et vous confirmons avoir fait le nécessaire pour déposer une enveloppe Soleau au nom de votre société.

Nous vous rappelons que l'enveloppe Soleau constitue un moyen de preuve de la date de création d'une invention et pourrait être éventuellement utilisée pour faire valoir votre droit de possession antérieure.

L'Institut National de la Propriété Industrielle a enregistré cette Enveloppe en date du **19 Août 1996 sous le n° 64602.**

Nous vous remettons sous ce pli, la partie de l'Enveloppe Soleau qui vous revient ainsi qu'un exemplaire du document contenu dans celle-ci.

**Nous vous rappelons que cette partie de l'Enveloppe Soleau doit être conservée avec soin et ne doit en aucun cas être ouverte.**

Par ailleurs, nous vous rappelons que l'INPI a en charge le gardiennage de votre Enveloppe Soleau pendant 5 ans. Le renouvellement du gardiennage pour une durée similaire de 5 ans pourra être demandé avant l'expiration du premier délai de 5 ans par le paiement d'une nouvelle taxe.

Le délai pour procéder à ce renouvellement vous sera bien entendu rappelé en temps utile.

Nous restons bien entendu à votre entière disposition pour effectuer ce dépôt.

\* MANDATAIRES EUROPEENS

SECRETARIAT GÉNÉRAL

Yves CARON  
H.E.C.

AGENCES

51, AVENUE JEAN - JAURES - BP 7073  
69301 LYON CEDEX 07

232, AVENUE DU PRADO  
13295 MARSEILLE CEDEX 08

37, RUE DU VIEUX FAUBOURG  
59800 LILLE

MUNICH

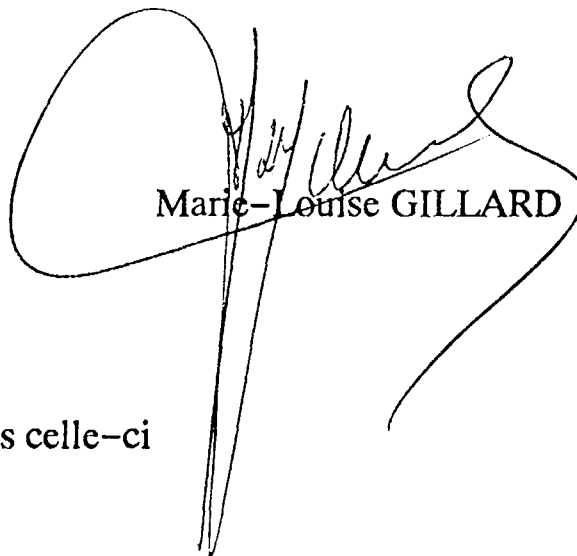
LUEG INS LAND 1



Nous nous permettons de joindre à la présente notre note de frais et honoraires pour le travail effectué concernant le dépôt de cette Enveloppe Soleau.

Au sujet du projet de collaboration avec le Laboratoire Pierre FABRE, nous souhaiterions avoir plus de précisions sur vos relations actuelles avec ce laboratoire et quel est l'état d'avancement des travaux de collaboration.

Nous restons à votre disposition pour discuter avec vous de cette affaire et vous prions de croire, Cher Monsieur, en l'expression de nos sentiments les meilleurs.



Marie-Louise GILLARD

**Pièces jointes :**

Enveloppe Soleau

Exemplaire du document contenu dans celle-ci

Notre Note de débit

# G. R. E. M. P. P.

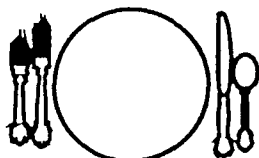
## groupe de Recherche et d'Etudes du Métabolisme Post-Prandial

Président : Professeur V. DURLACH - Tél. : 26 78 71 63 - Fax. : 26 78 31 02

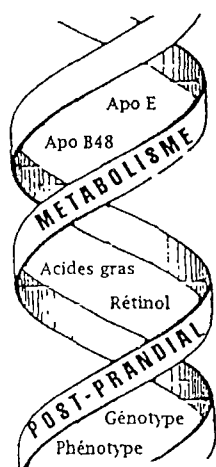
Secrétaire : Professeur B. VERGES - Tél. : 80 29 34 52 - Fax. : 80 29 35 19

Trésorier : Docteur B. GUERCI - Tél. : 83 65 64 49 - Fax. : 83 65 66 00

Reims, le 19 juillet 1996



### OBJET : DEPOT D'UNE ENVELOPPE SOLEAU CONCERNANT UN REPAS TEST LIPIDIQUE STANDARDISE



Le Groupe de Recherche et d'Etudes sur le Métabolisme Post-Prandial (association de loi 1901 déclarée au Journal Officiel du 24 août 1994) a mis au point un repas lipidique standardisé dont l'objet est de l'utiliser comme un test standardisé permettant de dépister les défauts d'épuration lipidique post-prandiaux chez le sujet sain et dans diverses situations pathologiques (obésité abdominale, situation de haut risque vasculaire, diabète ...).

L'évaluation du repas lipidique test considéré fait l'objet d'un protocole multicentrique (NANCY, REIMS, DIJON) d'étude clinique (PHRC - DGS 940276). Les résultats actuellement en notre possession (document joint courbe de triglycérides et de rétinyl palmitate) permettent d'envisager l'extension de l'étude de ce repas lipidique test sur de larges populations de sujets sains puis pathologiques.

Le repas lipidique test est développé en partenariat industriel avec le Laboratoire Pierre FABRE SANTE.

Pour les membres du Groupe de Recherche et d'Etudes du Métabolisme Post-Prandial,

**Professeur V. DURLACH,**  
Président.

#### Pièces jointes :

- Nature est composition du repas.
- Protocole d'évaluation (PHRC - DGS 940276)
- Déclaration du GREMPP au J.O., statuts de l'association.

Paris, le 14 août 1996

**ÉTUDE DE LA STANDARDISATION D'UN TEST DE CHARGE  
ORALE EN LIPIDES : APPLICATIONS A DES ETATS  
PATHOLOGIQUES.**

Le Groupe de Recherche et d'Etude sur le Métabolisme Lipidique Post-Prandial (G.R.E.M.P.P.) a trouvé un repas lipidique test standardisé (ou repas d'épreuve lipidique) permettant de dépister les défauts d'épuration lipidique post-prandiaux chez le sujet sain et dans diverses situations pathologiques (obésité abdominale, situation de haut risque vasculaire, diabète ...).

La composition de ce repas lipidique est pour 100 g de composition totale, celle qui figure dans l'Annexe 1 ci-jointe. Les résultats d'analyse de ce repas lipidique figure dans l'Annexe 2. Il est obtenu par mélange des différents constituants de préférence à la température ambiante.

Il peut être utilisé à titre diagnostique pour déterminer la capacité d'un sujet à épurer les particules exogènes riches en triglycérides.

La vitamine A (rétinol) est reconnue pour être un marqueur spécifique des particules riches en triglycérides (TRP) d'origine intestinale (chylomicrons et remnants). Le rétinol absorbé par voie orale est estérifié par les cellules intestinales et secrété en esters de rétinol (RE) dans la circulation générale à l'intérieur des chylomicrons nouvellement formés. Dans le compartiment plasmatique, les triglycérides sont hydrolysés laissant les esters de rétinol avec les chylomicrons. La clairance de ces RE dépend alors du degré et de la vitesse d'épuration des chylomicrons par la voie du récepteur hépatique. Une clairance altérée des RE après charge orale en vitamine A a été démontrée au cours des hypertriglycéridémies, des maladies rénales et en association avec l'incidence de maladie cardiovasculaire. L'étude cinétique de ce paramètre vitaminique en situation post-prandiale est ainsi un excellent reflet de la capacité d'un sujet à épurer ces particules exogènes riches en triglycérides.

La fabrication de ce repas test est réalisée en partenariat avec le LABORATOIRE Pierre FABRE.

Les résultats obtenus avec le repas lipidique test ci-dessus sur des sujets sains (dosage de triglycérides et de rétinyl palmitate) sont rassemblés sur la figure ci-jointe (Annexe 3).

Ces résultats sont en accord avec les données principales de la littérature chez le sujet sain et ils permettent d'envisager l'extension de l'étude de ce repas lipidique test sur de larges populations de sujets sains puis pathologiques.

Ce repas lipidique test fait actuellement l'objet du protocole multicentrique (NANCY, REIMS, DIJON) d'étude clinique (PHRC - DGS 940276) ci-joint (Annexe 4).

## **Annexe 2 : Articles publiés**

## Human Nutrition and Metabolism

### Delayed Changes in Postprandial Lipid in Young Normolipidemic Men after a Nocturnal Vitamin A Oral Fat Load Test<sup>1</sup>

Samy Hadjadj, Jean-Louis Paul,\* Laurent Meyer, Vincent Durlach,<sup>†</sup> Bruno Vergès,\*\* Olivier Ziegler, Pierre Drouin and Bruno Guerci<sup>2</sup>

*Service de Diabétologie, Nutrition et Maladies Métaboliques & Centre d'Investigation Clinique/INSERM, CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, 54201 Toul cedex, B.P. 303, France; \*Laboratoire de Biochimie, Hôpital Broussais AP-HP, 75014 Paris et Faculté de Pharmacie Paris XI, 92296 Chatenay-Malabry, France; <sup>†</sup>Clinique Médicale B U 62, CHU de Reims, 51092 Reims, France; and \*\*Clinique Médicale et Endocrinologique, CHU de Dijon, 21000 Dijon, France*

**ABSTRACT** The oral fat load tests (OFLT) used to study postprandial lipemia are generally conducted during the day. A nocturnal fat load test could be convenient and physiologically more appropriate. We have therefore compared the lipemic responses of 9 normolipidemic young men to OFLT given at 2200 h (nocturnal) and at 0700 h (diurnal). Triglyceride and retinyl palmitate concentrations were measured for 10 h. Peak plasma concentrations or areas under curves (AUC) for triglyceride after the diurnal and nocturnal tests were not significantly different [ $2.17 \pm 0.78$  (diurnal) vs.  $2.04 \pm 0.87$  mmol/L (nocturnal) and  $13.12 \pm 4.45$  (diurnal) vs.  $13.74 \pm 5.79$  mmol/(L · h) (nocturnal)]. Peak plasma concentrations and AUC retinyl palmitate for the two tests were not different [ $1.71 \pm 0.69$  (diurnal) vs.  $1.42 \pm 0.66$  mg/L (nocturnal) and  $7.17 \pm 3.98$  (diurnal) vs.  $6.63 \pm 4.23$  mg/(L · h) (nocturnal)]. The diurnal triglyceride peak occurred significantly earlier ( $4.3 \pm 1.2$  h) than the nocturnal peak ( $5.8 \pm 1.7$  h,  $P < 0.05$ ). We have developed a model using only three sample time points to predict AUC [triglyceride at 0 h, triglyceride at average peak-time (4 h for diurnal and 6 h for nocturnal tests), and triglyceride at 10 h], thus reducing the number of blood samples. The predicted AUC was well correlated with the total AUC after nocturnal OFLT ( $r = 0.98$ ,  $P < 0.0001$ ). The nocturnal test appeared to be well tolerated by the subjects. The three-point simplified protocol may well be suitable for studies on large groups of subjects. *J. Nutr.* 129: 1649–1655, 1999.

**KEY WORDS:** • *postprandial lipemia* • *circadian variations* • *oral fat load test* • *retinyl palmitate* • *humans*

Postprandial lipid metabolism has received considerable attention since it was shown that postprandial triglyceride-rich lipoproteins (TRL)<sup>3</sup> are involved in the development of atherosclerosis (Miesenbock and Patsch 1992, Zilversmit 1979). Many studies comparing patients with coronary artery disease and controls have demonstrated differences in postprandial triglyceride after an oral fat load test (OFLT) (Nikkila et al. 1994) and that the postprandial triglyceride concentration is an independent predictor of coronary artery disease in multivariate analysis (Patsch et al. 1992). A delayed clearance of retinyl palmitate, used to study the metabolism of TRL of intestinal origin, discriminates between patients with coronary artery disease and controls (Groot et al. 1991, Simpson et al. 1990), even after adjustment for fasting triglyceride or HDL cholesterol in normolipidemic men (Weintraub et al. 1996).

The fat tolerance tests as currently performed differ from

one study to another. There is no consensus about the time at which the study should begin; postprandial tests usually begin in the morning (Durlach et al. 1996, Patsch et al. 1992), but they can also start in the afternoon (Chen et al. 1992), or even at night (Zampelas et al. 1994). Bed rest is also required (Aldred et al. 1994), and the energy and fat load are high, making the study of postprandial lipemia using the OFLT a very unphysiologic situation. A nocturnal OFLT could be a suitable way to improve the conditions of the fat load because bed rest and fasting after the fat load are easier during the night time. A nocturnal fat test allows postprandial blood samples to be taken for 10 h without any need to alter the subjects' normal meal pattern.

This study was therefore conducted to compare the lipid responses of normolipidemic young men after OFLT given at 2200 h (nocturnal) and at 0700 h (diurnal). The changes in the concentrations of retinyl palmitate and triglyceride were monitored for 10 h in both tests.

#### SUBJECTS AND METHODS

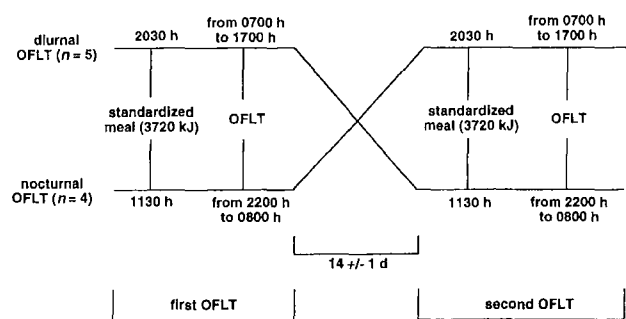
**Subjects.** Nine healthy male Caucasian volunteers were recruited from the local University and studied in the Nancy Clinical Research Center (INSERM-CHU). They satisfied the following cri-

<sup>1</sup> Supported by a grant from Ministère de la Santé et de la Solidarité Nationale: Projet Hospitalier de Recherche Clinique 1994. Experimental oral fat loads supplied by Laboratoires Pierre Fabre Santé, Castres, France.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.

<sup>3</sup> Abbreviations used: apo, apolipoprotein; AUC, area under the curve; AUC<sub>i</sub>, incremental AUC; OFLT, oral fat tolerance test; pAUC, predicted area under the curve; RP, retinyl palmitate; TRL, triglyceride-rich lipoproteins.





**FIGURE 1** Conditions for administration of diurnal and nocturnal oral fat load tests (OFLT) to normolipidemic young men ( $n = 9$ ). Subjects underwent two consecutive OFLT  $14 \pm 1$  d apart. Diurnal and nocturnal tests were performed in a random order.

teria: 1) normal body mass index ( $20\text{--}25 \text{ kg/m}^2$ ); 2) stable body weight ( $<2\%$  change in the last 3 mo); 3) age  $20\text{--}30$  y; 4) no symptoms of illness or ongoing medication; 5) no family history of premature coronary disease (before age 60 y); 6) moderate alcohol intake ( $<20 \text{ g/d}$ ); and 7) never smoked. They were all normal on physical examination, had normal glucose tolerance assessed by oral glucose tolerance test and normal blood chemistry profiles including the following: creatinine, sodium, potassium, chloride, total protein, total and direct bilirubin, and activities of aspartate or alanine aminotransferase and  $\gamma$ -glutamyl transferase. Their fasting lipid profiles were normal, i.e., LDL cholesterol  $<3.9 \text{ mmol/L}$ , HDL cholesterol  $>0.90 \text{ mmol/L}$  and triglyceride  $<1.25 \text{ mmol/L}$ . The participants maintained their usual physical activities and diet throughout the study. This project was approved by the Ethics committee of the Nancy University Hospital and informed written consent was obtained from all subjects.

**Study protocol.** All subjects underwent two consecutive OFLT. Each subject served as his own control. The time between tests was  $14 \pm 1$  d. Nocturnal and diurnal tests were performed in a random order. Five subjects did the first test starting in the morning and four in the late evening (Fig. 1). Subjects attended our Clinical Research Center at least 12 h before the beginning of the OFLT. They were instructed to refrain from strenuous exercise and any alcohol for 3 d before the OFLT.

The subjects were given a calibrated meal corresponding to step I of the National Cholesterol Education Program (Grundey 1994) (2890 kJ with 31% fat, 19% protein and 50% carbohydrate) at 2030 h on the day before the diurnal fat load. They fasted for 10 h, until 0700 h, at which time the diurnal oral fat load was given. Subjects were given the same calibrated meal at 1130 h on the morning before taking the nocturnal fat load. They fasted for 10 h, until 2200 h, when the nocturnal fat load was given.

**Dietary assessments.** A 5-d dietary record, including a weekend and three weekdays, was examined to determine the usual energy intake and the proportion of fats, carbohydrates and proteins of the subjects before each test. Subjects were asked to keep accurate dietary records, including food items and beverages consumed and accurate estimates of portion sizes. Food models and standard utensils were used to demonstrate portion sizes (Replica Food Limited, Hobson House, London, U.K.). Food and energy intakes were calculated using a computerized nutrient database (GENI; Micro 6, Nancy, France).

**Oral fat load test (OFLT).** The fat load was 180 g of a manufactured emulsified blended meal composed of 3.5% dried skimmed milk, 19.25% butter, 23.75% peanut oil, 22% chocolate, 30.25% water, 0.75% gelatin, 0.25% sorbic acid and 0.25% potassium sorbate (Laboratoire Pierre Fabre Santé, Castres, France). Its energy content was 3720 kJ (85% fat, 13% carbohydrates, 2% protein), with 35 g saturated fatty acid, 30 g monounsaturated fatty acid, 15 g polyunsaturated fatty acid and 88 mg cholesterol. The fatty acid composition of the OFLT was determined by gas chromatography. The OFLT contained 1.25% of the total fatty acids as 10:0, 1.5% as 12:0, 3.1% as 14:0, 20.3% as 16:0, 12.3% as 18:0, 43.7% as 18:1, 13.3% as 18:2 and 1.08% as 20:0. The fat load was ingested in 15 min with 200 mL

water; 100,000 IU retinyl ester (Avibon 50,000 IU; Theraplix-Rhone Poulenc Rorer, Paris, France) was added to the fat load to label intestinally derived lipoparticles. No further food or drink was allowed during the study. The participants remained supine and slept normally throughout the nocturnal test. They were instructed to remain in bed, supine, for the diurnal test.

**Sleep quality.** Sleep quality was assessed in the morning immediately after taking the last sample of the nocturnal OFLT by using an analog visual scale. One hundred percent represented an ideal night and 0% a sleepless night.

**Biochemical measurements.** A 21-gauge venous canula was placed in an antecubital vein. Blood samples were collected 30, 20 and 10 min before the ingestion of the fat load to determine plasma insulin and glucose concentrations. The means of the three values were taken as basal values. Blood samples were then taken immediately before the fat load and 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10 h after (T0, T2, T3, T4, T5, T6, T8 and T10). Plasma glucose and insulin concentrations were measured at T0 and T2. Apolipoprotein (apo) AI and apo B, plasma total LDL and HDL cholesterol, HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> cholesterol concentrations were determined at T0. For all samples from T0 to T10, 15 mL blood was drawn into vacutainer collection tubes to determine triglyceride and retinyl palmitate in the plasma and in the chylomicron and nonchylomicron fractions. All blood samples were immediately centrifuged at  $1000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Phenylmethylsulfonyl fluoride (10 mmol/L in isopropanol) and aprotinin (Trasylol, Bayer Pharma, Puteaux, France) were immediately added to the plasma to final concentrations of 10 and 28  $\mu\text{mol/L}$ , respectively (Karpe et al. 1995). The plasma was then frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until final analysis. Plasma glucose was determined soon after centrifugation. The chylomicron fraction (supernatant) was isolated by ultracentrifugation for 30 min at  $120,000 \times g$  in a Beckman XL-80 ultracentrifuge, rotor Ti-SW 41 (Palo Alto, CA). The infranatant was collected and named the nonchylomicron fraction; it contained triglyceride-rich lipoproteins (chylomicron remnants, VLDL and VLDL remnants). Mean recovery ( $\pm$  SD) of triglyceride was  $98 \pm 3\%$ .

Total cholesterol and triglyceride were determined enzymatically (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). HDL cholesterol was assessed by phosphotungstic acid precipitation, and LDL cholesterol was calculated according to the Friedewald formula (Friedewald et al. 1972). HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> cholesterol concentrations were determined by a direct electrophoretic method in a discontinuous gradient gel (Atger et al. 1991). Apo AI and apo B were determined by immunonephelometry with commercial kits (Beckman, Gagny, France).

Retinyl palmitate was measured by reverse-phase HPLC (System Gold, Beckman), according to De Ruyter and De Leenheer (1978). The detection limit was 0.018 mg/L. Plasma glucose was determined by enzymatic colorimetric method (PAP 250, bioMérieux). Total plasma insulin concentration was determined by immunoenzymatic assay (Insulin IMX, Abbott Laboratories, Tokyo, Japan). Cross reactivity with proinsulin was  $<0.05\%$ .

The apo E genotypes were obtained by *Hha* I restriction after polymerase chain reaction (Hixson and Vernier 1990).

**Statistical analysis.** Data are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 9$ . When the distribution of a variable was not normal, as assessed by Skewness and Kurtosis tests, data were log-transformed, and statistical analysis was done on the log-transformed data. Areas under the OFLT time-dependent concentration curves (area under curve, AUC) were calculated by the trapezoidal rule (Matthews et al. 1990). Incremental AUC (AUC<sub>i</sub>) was evaluated after subtracting the initial individual values (T0) for triglyceride from all respective postprandial measurements, yielding the net postprandial change.

The relative postprandial change was determined for plasma triglyceride after subtracting the initial value for triglyceride from all respective postprandial measurements and subsequently dividing it by the initial value for triglyceride, i.e.,  $[(T_x - T_0)/T_0]$ . This method allows the time at which the triglyceride concentration returned to baseline to be more clearly identified and takes into account differences in the initial value of triglyceride between each test.

The period was defined as the order of the test (first administered diurnally or nocturnally). ANOVA was used for a crossover study with period, postprandial times, and interaction factors. Two-way repeated-measures ANOVA was used to assess the effect of postpran-

TABLE 1

Clinical and laboratory characteristics of the normolipidemic young men<sup>1</sup>

Subject	Age y	BMI kg/m <sup>2</sup>	WHR	Cholesterol	LDL C	Triglyceride	HDL C	HDL <sub>2</sub> C	HDL <sub>3</sub> C	Apo		Apo E genotype
										Apo AI	Apo B	
				mmol/L						g/L		
1	21	21.8	0.87	4.45	2.88	1.02	1.11	0.46	0.65	1.14	0.74	E3/E4
2	20	22.6	0.85	3.16	1.67	0.67	1.19	0.37	0.82	1.23	0.51	E3/E3
3	20	22.4	0.79	4.15	2.58	0.83	1.19	0.29	0.90	1.28	0.63	E3/E3
4	26	21.9	0.84	4.83	3.27	1.21	1.01	0.20	0.81	1.07	0.87	E3/E4
5	25	24.6	0.87	5.00	3.70	0.66	1.00	0.47	0.53	1.07	0.90	E3/E3
6	24	22.2	0.83	3.23	1.90	0.70	1.01	0.45	0.56	1.08	0.50	E3/E4
7	20	22.1	0.81	4.44	2.74	0.60	1.43	0.81	0.62	1.31	0.64	E3/E3
8	20	21.9	0.78	4.42	2.31	1.24	1.55	0.54	1.01	1.51	0.65	E3/E3
9	28	22.0	0.85	2.79	1.55	0.48	1.02	0.30	0.72	1.18	0.39	E3/E3
Mean	22.7	22.4	0.83	4.05	2.51	0.82	1.17	0.43	0.74	1.21	0.65	
sd	3.1	0.9	0.03	0.79	0.73	0.27	0.20	0.18	0.16	0.14	0.17	

<sup>1</sup> BMI, body mass index; apo, apolipoprotein; WHR, waist-to-hip ratio.

dial times on postprandial triglyceride and retinyl palmitate concentrations. When ANOVA was significant, or when variables were measured only once, means were compared by Student's paired *t* test. The association between two continuous variables was determined by the linear regression coefficient. The level of significance was *P* < 0.05. Statview IV.5 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA) was used for all calculations.

## RESULTS

**Clinical and laboratory characteristics.** Table 1 summarizes the clinical and laboratory characteristics of the subjects. The OFLT was well tolerated. No subject suffered from nausea or reported any adverse reactions.

ANOVA of the crossover study revealed no period effect and no postprandial × period interaction for any variable studied. Therefore, the individual data for the two periods of

each OFLT were pooled for analyses. There was no significant difference between the energy intakes or the proportional intakes of carbohydrate, fat or protein assessed before each test. Mean energy intake was 12,900 ± 3100 kJ/d, comprised of 150 ± 36 g fat, 324 ± 100 g carbohydrate and 110 ± 22 g protein. Saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid represented 68.1 ± 14.6, 51.7 ± 11.7 and 25.8 ± 9.2 g, respectively.

Mean sleep quality was 59.3 ± 14.6% (range: 43–88%). Sleep quality was significantly better if the subjects had done the diurnal OFLT first (68.4 ± 13.5) than if the nocturnal OFLT was done first (48 ± 4.4%, *P* < 0.03).

**Conventional postprandial lipid parameters.** The plasma triglyceride peak concentrations for the diurnal and nocturnal tests did not differ (Table 2). The total AUC and AUC<sub>i</sub> for plasma triglyceride from the two tests were similar. The tri-

TABLE 2

Postprandial responses of normolipidemic young men after diurnal and nocturnal oral fat load tests according to conventional lipid variables<sup>1</sup>

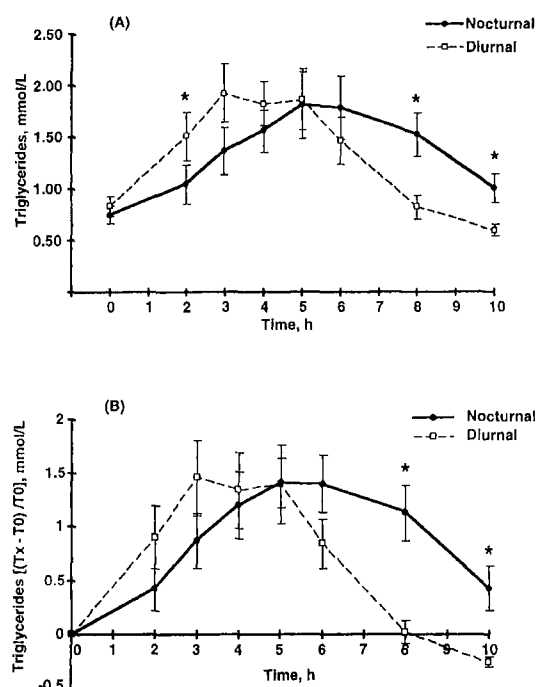
Variable	Time of fat tolerance test	
	0700 h	2200 h
Plasma triglyceride peak time, h	4.3 ± 1.2	5.8 ± 1.72
Triglyceride peak concentration, mmol/L	2.17 ± 0.78	2.04 ± 0.87
Plasma triglyceride AUC, <sup>3</sup> mmol/(L · h)	13.12 ± 4.45	13.74 ± 5.79
Plasma triglyceride AUC, <sup>3</sup> mmol/(L · h)	4.85 ± 3.75	6.30 ± 4.05
CM triglyceride peak concentration, mmol/L	0.72 ± 0.33	0.62 ± 0.31
CM triglyceride AUC, <sup>3</sup> mmol/(L · h)	3.16 ± 1.58	3.16 ± 1.62
nCM triglyceride peak concentration, mmol/L	1.16 ± 0.34	1.15 ± 0.45
nCM triglyceride AUC, <sup>3</sup> mmol/(L · h)	8.27 ± 2.38	9.03 ± 3.54
Plasma retinyl palmitate peak time, h	4.5 ± 1.8	5.5 ± 1.7
Retinyl palmitate peak concentration, mg/L	1.71 ± 0.69	1.42 ± 0.66
Plasma retinyl palmitate AUC, <sup>3</sup> mg/(L · h)	7.17 ± 3.98	6.63 ± 4.23
CM retinyl palmitate peak concentration, mg/L	0.99 ± 0.37	0.79 ± 0.43
CM retinyl palmitate AUC, <sup>3</sup> mg/(L · h)	3.42 ± 2.10	3.49 ± 2.73
nCM retinyl palmitate peak concentration, mg/L	0.79 ± 0.45	0.77 ± 0.32
nCM retinyl palmitate AUC, <sup>3</sup> mg/(L · h)	3.48 ± 2.48	3.14 ± 1.89

<sup>1</sup> Data are means ± SD; *n* = 9.

<sup>2</sup> Means were compared by Student's paired *t* test. The difference was significant only for the plasma triglyceride peak time (*P* < 0.05).

AUC, area under the curve; CM, chylomicron fraction; nCM, nonchylomicron fraction.

<sup>3</sup> Areas under the oral fat load test (OFLT) time-dependent concentration curves (AUC) were calculated by the trapezoidal method. Incremental AUC (AUC<sub>i</sub>) was defined as the AUC above baseline triglyceride concentration.



**FIGURE 2** Postprandial triglyceride responses in normolipidemic young men after administration of diurnal and nocturnal oral fat load tests (OFLT). Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). (A) Postprandial triglyceride responses in diurnal and nocturnal OFLT. (B) Relative postprandial changes in plasma triglyceride. The relative postprandial change in plasma triglyceride was obtained by subtracting the initial triglyceride value from all subsequent postprandial measurements and then dividing it by the initial value for triglyceride, i.e.,  $[(Tx - T_0)/T_0]$ . Repeated-measures ANOVA was performed to assess the effect of the time of fat load administration and sample times on postprandial triglyceride concentrations. When ANOVA was significant, means were compared by Student's paired  $t$  test. \* $P < 0.05$ .

glyceride peak values and the AUC of triglyceride in the chylomicron and nonchylomicron fractions were not significantly different in the two tests.

The total plasma retinyl palmitate peaks for the nocturnal and diurnal tests were not significantly different. The total AUC for plasma retinyl palmitate was also not significantly different. The retinyl palmitate peak values and the retinyl palmitate AUC for the chylomicron and nonchylomicron fractions were not significantly different for both tests.

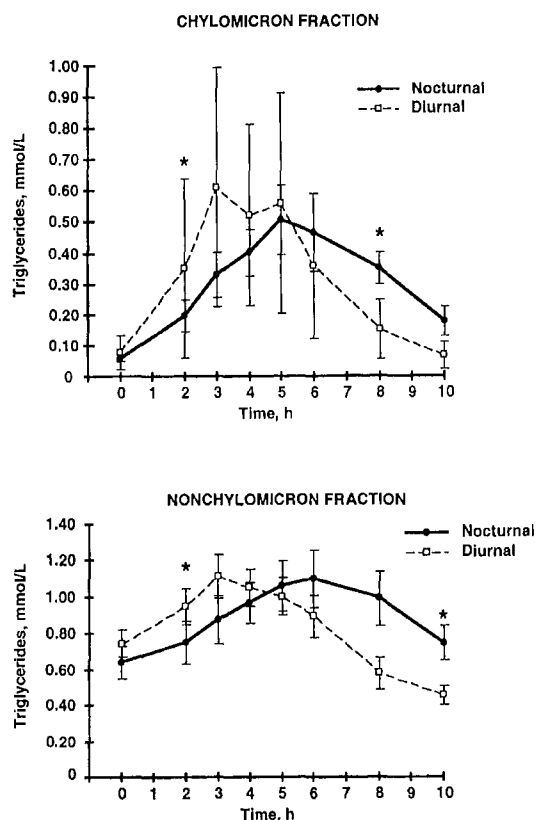
**Kinetics of the postprandial lipemic response.** The triglycerides reached peak values at different times in the diurnal and nocturnal lipemic responses ( $P < 0.05$ ) (Table 2, Fig. 2A). The nocturnal peak occurred significantly later than the diurnal peak in seven of the nine subjects. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of the interaction between the time of the fat load test administration and postprandial times on triglyceride concentrations ( $f = 5.03$ ,  $P < 0.0001$ ), indicating that the curves for plasma triglyceride concentrations after each test were significantly different.

The triglyceride concentrations at T2 were higher in the diurnal test ( $1.51 \pm 0.69$  mmol/L) than in the nocturnal test ( $1.04 \pm 0.58$  mmol/L,  $P < 0.02$ ). However, the triglyceride values at T8 and T10 were higher in the nocturnal test ( $1.52 \pm 0.63$  mmol/L,  $P < 0.04$  and  $1.01 \pm 0.42$  mmol/L,  $P < 0.03$ ) than in the diurnal test ( $0.82 \pm 0.34$  mmol/L and  $0.59 \pm 0.16$  mmol/L) (Fig. 2A). The plasma triglyceride concentration had

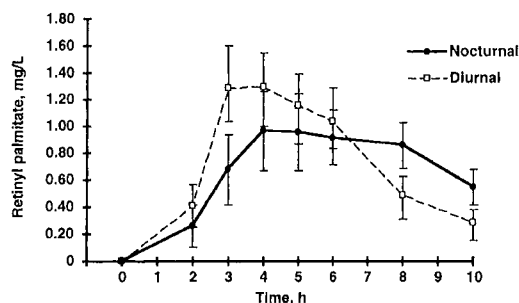
returned to its initial value at T8; it continued to decrease between T8 and T10 in the diurnal test, but remained above baseline at T10 in the nocturnal test (Fig. 2B).

Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of the interaction between the time of the fat load test administration and postprandial times on triglyceride concentrations in the chylomicron and nonchylomicron fractions ( $f = 3.24$ ,  $P < 0.004$  and  $f = 8.83$ ,  $P < 0.0001$ , respectively), indicating that the changes in the triglyceride concentrations after the two tests differed (Fig. 3). The kinetic responses after OFLT for lipid subfractions were similar to those for total plasma triglycerides. Triglyceride peak times in the chylomicron and nonchylomicron fractions were similar to one another and were synchronous with total plasma triglyceride peak times, i.e.,  $5.8 \pm 1.7$  h after nocturnal OFLT, and  $4.3 \pm 1.2$  h after diurnal OFLT ( $P < 0.05$ ).

**Retinyl palmitate responses.** The total plasma retinyl palmitate peak time tended to be later after a nocturnal OFLT than after a diurnal OFLT (Table 2, Fig. 4). Two-way repeated-measures ANOVA showed no significant effect of the interaction between the time of the fat load test administration and postprandial times on plasma retinyl palmitate concentrations ( $f = 1.92$ ,  $P = 0.073$ ). The nocturnal peak time



**FIGURE 3** Postprandial changes in triglycerides in lipid subfractions (chylomicron and nonchylomicron fractions) in normolipidemic young men after administration of diurnal and nocturnal oral fat load tests (OFLT). Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). (A) Postprandial chylomicron triglyceride responses after diurnal and nocturnal OFLT. (B) Postprandial nonchylomicron triglyceride responses after diurnal and nocturnal OFLT. Repeated-measures ANOVA was performed to assess the effect of the time of fat load administration and sample times on postprandial triglyceride concentrations. When ANOVA was significant, means were compared by Student's paired  $t$  test. \* $P < 0.05$ .



**FIGURE 4** Postprandial plasma retinyl palmitate responses after diurnal and nocturnal oral fat load tests in normolipidemic young men. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). Repeated-measures ANOVA was performed to assess the effect of the time of fat load administration and sample times on postprandial retinyl palmitate concentrations.

occurred later than the diurnal peak time in only four of the nine subjects. The retinyl palmitate concentrations at T8 and T10 tended to be higher after nocturnal OFLT than after diurnal OFLT ( $0.86 \pm 0.51$  vs.  $0.49 \pm 0.42$  mg/L,  $P = 0.08$  and  $0.55 \pm 0.39$  vs.  $0.29 \pm 0.28$  mg/L,  $P = 0.06$ , respectively).

The kinetic responses of lipid subfractions and the total plasma retinyl palmitate were similar. Retinyl palmitate peak times in the chylomicron and nonchylomicron fractions were similar to one another and were synchronous with total plasma retinyl palmitate peak times, i.e.,  $5.5 \pm 1.7$  h after nocturnal OFLT and  $4.5 \pm 1.8$  h after diurnal OFLT ( $P > 0.05$ ). Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of the interaction between the time of the fat load test administration and postprandial times on retinyl palmitate concentrations only in the nonchylomicron fractions ( $F = 2.61$ ,  $P < 0.05$ ).

The plasma insulin concentrations at T0 for the diurnal ( $41 \pm 18$  pmol/L) and nocturnal ( $25 \pm 9$  pmol/L) OFLT were not different ( $P > 0.05$ ). The diurnal and nocturnal insulin concentrations at T2 also did not differ ( $76 \pm 28$  vs.  $85 \pm 31$  pmol/L).

**A postprandial test model.** We have tried to predict the postprandial AUC (pAUC) from three triglyceride determinations instead of the eight measurements carried out during these tests to reduce the number of blood samples taken and the number of biochemical determinations done in routine clinical practice. Two models were developed. The three triglyceride determinations used for the first were as follows: triglycerides at T0, at individual peak concentrations and at T10. The second model used the triglyceride values at T0, at average peak time (T4 for diurnal and T6 for nocturnal tests) and at T10. The pAUC was divided by the total AUC measured by the trapezoidal rule, and data for the two tests were compared.

The first model gave a diurnal pAUC that was correlated with total diurnal AUC ( $r = 0.92$ ,  $P < 0.001$ ). The nocturnal pAUC was also positively and significantly correlated with total nocturnal AUC ( $r = 0.99$ ,  $P < 0.0001$ ). The ratios of pAUC/total AUC were  $110.3 \pm 11.7\%$  for diurnal OFLT and  $107 \pm 6.4\%$  for nocturnal OFLT. The CV of this ratio was 10.6% after the diurnal test and 6% after the nocturnal test.

The second model gave a diurnal pAUC that was correlated with the diurnal total AUC ( $r = 0.90$ ,  $P < 0.001$ ). The nocturnal pAUC was also significantly correlated with the nocturnal total AUC ( $r = 0.98$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 5). The ratios of pAUC/total AUC were  $97.1 \pm 14.8\%$  for the diurnal OFLT and  $95.0 \pm 9.1\%$  for the nocturnal OFLT. The CV of

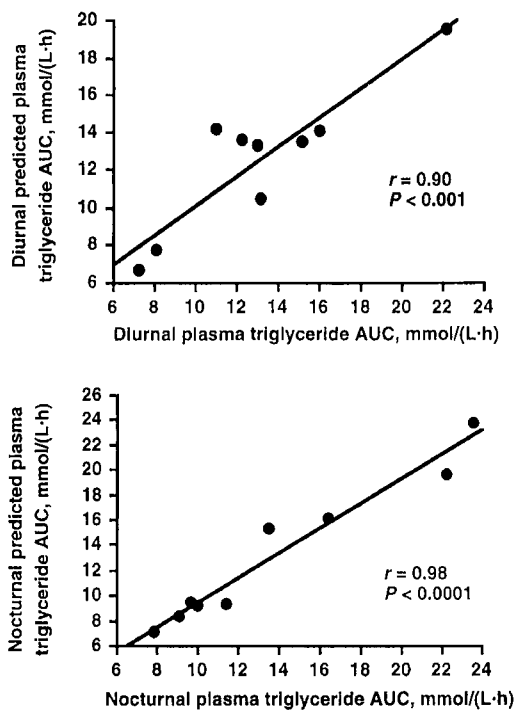
this ratio was 15.3% after the diurnal test and 9.6% after the nocturnal test.

The average interindividual CV of postprandial plasma triglyceride were, on average, 40.5% for the diurnal OFLT and 46.6% for the nocturnal OFLT. Analysis of only the three major plasma triglyceride points of the second model (T0, T4 for diurnal and T6 for nocturnal tests, and T10) showed no difference between the interindividual CV of diurnal and nocturnal postprandial responses (36.1 vs. 42.8%).

## DISCUSSION

The development of fat tolerance tests is based on the belief that the postprandial period is more informative than the fasting state for lipid metabolism because most of our life is spent in the postprandial state (Zilversmit 1979). However, the usual OFLT is a very unphysiologic test, with bed rest for a large part of the day (Aldred et al. 1994), no food intake after the fat load and a fat meal that provides a very unusual energy and fat intake in the early morning (often  $>100$  g fat) (Patsch et al. 1983, Weintraub et al. 1996). We have therefore looked for a more convenient oral fat load test. Bed rest, drinking restrictions and fasting after the fat load are more readily obtained during the night, and energy and fat intakes are higher at dinner than at breakfast or lunch (Fricker et al. 1990, Winkler et al. 1995). The fat load (80 g) used in our OFLT was close to the usual fat intake of the subjects during dinner (75 g on average). Finally, the use of a nocturnal fat test allowed a 10-h postprandial blood sampling, without any need to alter the subjects' normal meal patterns.

The subjects were instructed to continue their usual activ-



**FIGURE 5** Models of the postprandial tests. Postprandial area under the curve (AUC) was predicted from three triglyceride determinations (pAUC), instead of the eight measurements carried out during the test. The three points were as follows: triglyceride at T0, at average peak time (T4 for diurnal and T6 for nocturnal tests) and at T10.

ities before the test meal to minimize potential confounding factors because exercise alters lipid metabolism (Aldred et al. 1994, Foger and Patsch 1995). Subjects refrained from strenuous exercise during the 3 d before the tests to limit the influence of acute exercise. No alcohol was allowed in the 3 d preceding each test because alcohol also alters lipid metabolism (Hartung et al. 1993, Pownal, 1994). The body weight of all subjects was constant throughout the study. A constant energy, total and saturated fat, carbohydrate and protein intake was ensured, and the food intake before each test was identical. The time between tests was  $14 \pm 1$  d; this was similar to the time in a previous study that indicated good reproducibility between two consecutive oral fat loads (Brown et al. 1992).

No subject suffered from nausea or reported any adverse reactions. Tolerance of the test and the quality of the participants' sleep were assessed subjectively. Sleep during the nocturnal test was not too different from normal ( $59.3 \pm 14.6\%$ ). The subjects also reported that the oral fat load was more easily ingested at 2200 h than at 0700 h. They considered the nocturnal fat load to be more convenient because they could not drink or eat and had to remain supine during both tests. This was harder during the diurnal test. Thus, the nocturnal OFLT appeared to be well tolerated.

The lipid response curves obtained during the diurnal OFLT are in agreement with those of previous studies on postprandial responses. The mean plasma triglyceride peak after an oral fat load occurred 4 h later (Karpe et al. 1995, Lewis et al. 1990 and 1991). The mean plasma triglyceride peak times obtained in several studies is one of the three triglyceride diurnal determinations (T4) that we used in our second postprandial model. The synchronous nature of the triglyceride peak times in the plasma, chylomicron and nonchylomicron fractions has also been reported (Schrezenmeir et al. 1992). The times of the triglyceride peaks in the chylomicron and nonchylomicron fractions may be similar because the triglyceride-rich lipoproteins derived from the liver (nonchylomicron fraction) account for a large part of the postprandial lipemia responses (Karpe et al. 1995). Others have demonstrated that 80% of the increase in postprandial triglyceride-rich lipoprotein particles is accounted for by VLDL (Schneeman et al. 1993). The mean plasma peak of retinyl palmitate occurred 4.5 h after the oral fat load in our study, in agreement with the findings of others (Cortner et al. 1987, Uiterwaal et al. 1994), although some have reported a later peak time (Heller et al. 1993, Patsch et al. 1992).

The postprandial retinyl palmitate and triglyceride concentrations for the diurnal and nocturnal fat loads were not different, taking into account the usual postprandial variables, i.e., peak values, AUC and AUCi. The triglycerides and retinyl palmitate in the plasma and in the chylomicron and nonchylomicron subfractions were similar. The triglyceride peak concentrations in the two tests were also significantly correlated. These results are in agreement with those of Romon et al. (1997), who found no difference in the AUC of triglyceride, VLDL-triglyceride and serum cholesterol for the diurnal and nocturnal tests. However, the sleep-wake rhythm was deliberately disturbed in this study, and the test meals were given at different times, with the nocturnal test beginning at 0100 h. Finally, the plasma triglyceride peak times were not different (Romon et al. 1997).

The nocturnal lipid response occurred significantly more slowly, with the plasma and chylomicron and nonchylomicron triglyceride peak times occurring significantly later. The initial triglyceride concentrations (T2) were higher in the diurnal test, whereas the late triglyceride concentrations (T8, T10)

were lower than in the nocturnal concentrations. The nocturnal curve appeared to be shifted to the right and the triglyceride concentrations remained above the baseline T0 concentrations at T10. Although they did not compare diurnal and nocturnal lipid responses, Zampelas et al. (1994) were the first to perform a nocturnal fat load test and to show that the postprandial triglyceride curves reached their maxima 5–7 h after the fat load. Our results are in keeping with those of Hampton et al. (1996), who simulated nocturnal OFLT by shifting the biological clocks of nine subjects. The test meals were given at 0100 and 2100 h. The nocturnal triglyceride values were delayed much like those reported here (Hampton et al. 1996).

The delayed lipemic response reported here and by others may be due to slower gastric emptying at night (Goo et al. 1987). Direct assessment of gastric emptying in diurnal and nocturnal OFLT may be required to confirm this. The slower removal of TRL during the night may also shift the triglyceride nocturnal curve to the right, perhaps because of a nocturnal decrease in glucose tolerance (Van Cauter et al. 1989). The triglyceride peak was delayed after a diurnal fat tolerance test in the more glucose-intolerant patients, i.e., those patients with diabetes and hypertriglyceridemia had a later triglyceride peak than the nondiabetic controls (Lewis et al. 1991).

We believe this is the first time that nocturnal retinyl palmitate postprandial metabolism has been determined. We found no difference between the diurnal and nocturnal retinyl palmitate concentrations, for the AUC or the peak concentrations, in the plasma or in the chylomicron and nonchylomicron fractions. In addition, there was no significant difference between the times of the diurnal and nocturnal plasma retinyl palmitate peaks. Slow gastric emptying decreases intraluminal lipolysis (Maes et al. 1996), and gastric emptying is significantly less rapid in the evening than in the morning in humans (Goo et al. 1987). Because retinyl palmitate metabolism is especially linked to pancreatic cholesterolesterase and a specific brush border hydrolase, plasma retinyl palmitate could be less influenced by the rate of intraluminal lipolysis than plasma triglycerides (Rigtrup and Ong 1992). In addition, in our study four of the nine healthy subjects had a second nocturnal plasma retinyl palmitate peak, whereas only one of nine had a second plasma triglyceride peak. A second postprandial retinyl palmitate peak has been reported in several studies (Cohn et al. 1989). These second peaks occur 8–10 h after the meal and may reflect delayed gastric emptying (Bergeron and Havel 1997). In our study, the difference between diurnal and nocturnal second plasma retinyl palmitate peaks tended to be significant ( $P < 0.05$ ; data not shown).

The AUC is the most frequently used index for evaluating postprandial lipemia (Durlach et al. 1996, Patsch et al. 1992, Simpson et al. 1990) and is a discriminant marker between controls and patients with altered postprandial TRL removal (Karpe and Hamsten 1995, Miesenbock and Patsch 1992). The two models developed to reduce the numbers of blood samples taken and processed are both satisfactory; the pAUC was correlated with the AUC, particularly during the nocturnal test. The first model cannot be used in routine clinical practice because the individual triglyceride peak concentrations vary. The second model appears to be more suitable because the pAUC may be calculated from three lipid determinations, regardless of the individual peak values (T6 for nocturnal test). We also checked this second model of pAUC on a population with various stages of insulin resistance and obesity (17 obese patients and 33 healthy controls). Using the same postprandial test model during the diurnal period, we showed that the pAUC is correlated with the AUC measured

by the trapezoidal rule (unpublished data). In addition, the level of significance between obese subjects and controls was higher with pAUC than with AUC, confirming the discriminant power of the predicted postprandial AUC with three triglyceride determinations instead of the eight or more usually used (unpublished data). Finally, the smaller CV for the nocturnal lipid response, when expressed as the pAUC/total AUC ratio, also indicates that the nocturnal test is more suitable for epidemiologic studies than are the diurnal fat tolerance tests.

However, our study was conducted in a small group of normolipidemic healthy subjects. We do not yet know whether this model can be applied to other populations who were eligible for oral fat load tests. Further studies are required to assess its reliability in larger studies over a wide range of circumstances. Nevertheless, nocturnal OFLT appears to be well tolerated and convenient for use in healthy normocholesterolemic individuals. The number of lipid determinations may be reduced to three to make this test suitable for use in larger studies. However, these data must be confirmed, particularly in patients affected by abnormal triglyceride removal.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Centre d'Investigation Clinique du CHU de Nancy for clinical help and the staff of Broussais Hospital for technical assistance. Owen Parkes checked the English text.

### LITERATURE CITED

- Aldred, H. E., Perry, I. C. & Hardman, A. E. (1994) The effect of a single bout of brisk walking on postprandial lipemia in normolipidemic young adults. *Metabolism* 43: 836-841.
- Atger, V., Malon, D., Bertière, M. C., N'Diaye, F. & Girard-Globa, A. (1991) Cholesterol distribution between high-density-subfractions HDL2 and HDL3 determined in serum by discontinuous gradient gel electrophoresis. *Clin. Chem.* 37: 1149-1152.
- Bergeron, N. & Havel, R. J. (1997) Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr. Opin. Lipidol.* 8: 43-52.
- Brown, S. A., Chambless, L. E., Sharrett, A. R., Gotto, A. J. & Patsch, W. (1992) Postprandial lipemia: reliability in an epidemiologic field study. *Am. J. Epidemiol.* 136: 538-545.
- Chen, Y. D., Skowronski, R., Coulston, A. M., Pietarinen, J., Hollenbeck, C. B. & Reaven, G. M. (1992) Effect of acute variations in dietary fat and carbohydrate intake on retinyl ester content of intestinally derived lipoproteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 28-32.
- Cohn, J. S., McNamora, J. R., Krasinski, S. D., Russell, R. M. & Schaefer, E. J. (1989) Role of triglyceride-rich lipoprotein from the liver and intestine in the etiology of postprandial peaks in plasma triglyceride concentration. *Metabolism* 38: 484-490.
- Cortner, J. A., Coates, P. M., Le, N. A., Cryer, D. R., Ragni, M. C., Faulkner, A. & Langer, T. (1987) Kinetics of chylomicron remnant clearance in normal and in hyperlipoproteinemic subjects. *J. Lipid Res.* 28: 195-206.
- De Ruyter, M.G.M. & De Leenheer, A. P. (1978) Simultaneous determination of retinol and retinyl esters in serum or plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 24: 1920-1924.
- Durlach, V., Attia, N., Zahouani, A., Leutenegger, M. & Girard-Globa, A. (1996) Postprandial cholesteryl ester transfer and high density lipoprotein composition in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients. *Atherosclerosis* 120: 155-165.
- Fogor, B. & Patsch, J. R. (1995) Exercise and postprandial lipaemia. *J. Cardiovasc. Risk* 2: 316-322.
- Fricker, J., Giroux, S., Fumeron, F. & Apfelbaum, M. (1990) Circadian rhythm of energy intake and corpulence status in adults. *Int. J. Obes.* 14: 387-393.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Frederickson, J. (1972) Estimation of the concentration of low-density cholesterol in plasma without the use of the preparative ultra-centrifuge. *Clin. Chem.* 18: 499-502.
- Goo, R. H., Moore, J. G., Greenberg, E. & Alazraki, N. (1987) Circadian variation in gastric emptying of meals in humans. *Gastroenterology* 93: 515-518.
- Groot, P.H.E., Van Stiphout, W.A.H.J., Krauss, X. H., Jansen, H., Van Tol, A., Van Ramshorst, E., Chin-On, S., Hofman, A., Cresswell, S. R. & Havekes, L. (1991) Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb.* 11: 653-662.
- Grundy, S. M. (1994) National Cholesterol Education Program: second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation* 89: 1329-1445.
- Hampton, S. M., Morgan, L. M., Lawrence, N., Anastasiadou, T., Norris, F., Deacon, S., Ribeiro, D. & Arendt, J. (1996) Postprandial hormone and metabolic responses in simulated shift work. *J. Endocrinol. Investig.* 151: 259-267.
- Hartung, G. H., Lawrence, S. J., Reeves, R. S. & Foreyt, J. P. (1993) Effect of alcohol and exercise on postprandial lipemia and triglyceride clearance in men. *Atherosclerosis* 100: 33-40.
- Heller, F. R., Vandenplas, C., Desager, J. P. & Harvenet, C. (1993) The vitamin A fat-loading test in young normolipidemic subjects. *Clin. Chim. Acta* 219: 167-176.
- Hixson, J. & Vernier, D. (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha* I. *J. Lipid Res.* 31: 545-548.
- Karpe, F., Bell, M., Björkegren, J. & Hamsten, A. (1995) Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 199-207.
- Karpe, F. & Hamsten, A. (1995) Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 6: 123-129.
- Lewis, G. F., O'Meara, N. M., Soltys, P. A., Blackman, J. D., Iverius, P. H., Druetzler, A. F., Getz, G. S. & Polonsky, K. S. (1990) Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 1041-1050.
- Lewis, G. F., O'Meara, N. M., Soltys, P. A., Blackman, J. D., Iverius, P. H., Pugh, W. L., Getz, G. S. & Polonsky, K. S. (1991) Fasting hypertriglyceridemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus is an important predictor of postprandial lipid and lipoprotein abnormalities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72: 934-944.
- Maes, B. D., Ghoo, Y. F., Geypens, B. J., Hiele, M. I. & Rutgeerts, P. J. (1996) Relation between gastric emptying rate and rate of intraluminal lipolysis. *Gut* 38: 23-27.
- Matthews, J.N.S., Altman, D. G., Campbell, M. J. & Royton, P. (1990) Analysis of serial measurements in medical research. *Br. Med. J.* 300: 230-235.
- Miesenböck, G. & Patsch, J. R. (1992) Postprandial hyperlipidemia: the search for the atherogenic lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 3: 196-201.
- Nikkilä, M., Solakivi, T., Lehtimäki, T., Koivula, T., Laippala, P. & Astrom, B. (1994) Postprandial plasma lipoprotein changes in relation to apolipoprotein E phenotypes and low density lipoprotein size in men with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 106: 149-157.
- Patsch, J. R., Karlin, J. B., Scott, L. W., Smith, L. C. & Gotto, A. M. (1983) Inverse relationship between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1449-1453.
- Patsch, J. R., Miesenböck, G., Hopferwieser, T., Mühlberger, V., Knapp, E., Dunn, J. K., Gotto, A. M. & Patsch, W. (1992) Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb.* 12: 1336-1345.
- Pownall, H. J. (1994) Dietary ethanol is associated with reduced lipolysis of intestinally derived lipoproteins. *J. Lipid Res.* 35: 2105-2113.
- Rigtrup, K. M. & Ong, D. E. (1992) A retinyl ester hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochemistry* 31: 2920-2926.
- Romon, M., Le Fur, C., Lebel, P., Edmé, J. L., Fruchart, J. C. & Dallongeville, J. (1997) Circadian variation of postprandial lipemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 934-940.
- Schneeman, B. O., Kotite, L., Todd, K. M. & Havel, R. J. (1993) Relationship between the responses of triglyceride-rich lipoprotein in blood plasma containing apolipoproteins B-48 and B-100 to fat-containing meal in normolipidemic humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2069-2073.
- Schrezenmeier, J., Weber, P., Probst, R., Biesalski, H. K., Luley, C., Prellwitz, W., Krause, U. & Beyer, J. (1992) Postprandial pattern of triglyceride-rich lipoprotein in normal-weight humans after an oral lipid load: exaggerated triglycerides and altered insulin response in some subjects. *Ann. Nutr. Metab.* 34: 186-196.
- Simpson, H. S., Williamson, C. M., Olivecrona, T., Pringle, S., Maclean, J., Lorimer, A. R., Bonnetfous, F., Bogaeievsky, Y., Packard, C. J. & Shepherd, J. (1990) Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 85: 193-202.
- Uitenwaal, C.S.P.M., Grobbee, D. E., Witteman, J.C.M., Van Stiphout, W.A.H.J., Krauss, X. H., Havekes, L. M., De Bruijn, A. M., Van Tol, A. & Hofman, A. (1994) Postprandial triglyceride response in young adult men and familial risk for coronary atherosclerosis. *Ann. Intern. Med.* 121: 576-583.
- Van Cauter, E., Desir, D., Decoster, C., Fery, F. & Balasse, E. G. (1989) Nocturnal decrease in glucose tolerance during constant glucose infusion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69: 604-611.
- Weintraub, M. S., Grosskopf, I., Rassin, T., Miller, H., Charach, G., Rotmensh, H. H., Liron, M., Rubinstein, A. & Iaina, A. (1996) Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *Br. Med. J.* 312: 935-939.
- Winkler, G., Doring, A. & Keil, U. (1995) Mealtime patterns in a southern German population. Results from the WHO MONICA 1984/1985 Augsburg nutritional survey project. *Z. Ernährungswiss.* 34: 2-9.
- Zampelas, A., Peel, A. S., Gould, B. J., Wright, J. & Williams, C. M. (1994) Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apolipoprotein levels in healthy men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48:842-848.
- Zilversmit, D. B. (1979) Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 60: 473-485.

# Relationship between altered postprandial lipemia and insulin resistance in normolipidemic and normogluucose tolerant obese patients

B Guerci<sup>1\*</sup>, B Vergès<sup>2</sup>, V Durlach<sup>3</sup>, S Hadjadj<sup>1</sup>, P Drouin<sup>1</sup> and J-L Paul<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Investigation Clinique (CIC-Inserm/CHU de Nancy), Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Maladies de la Nutrition, Hôpital Jeanne d'Arc, 54201 Toul, France; <sup>2</sup>Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques, CHU de Dijon, 21000 Dijon, France; <sup>3</sup>Service d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques et Médecine Interne, CHU de Reims, 51092 Reims, France; and <sup>4</sup>Laboratoire de Biochimie, Hôpital Broussais, AP-HP, 75014 Paris, Faculté de Pharmacie, Paris XI, 92296 Chatenay-Malabry, France

**OBJECTIVE:** Although there are changes in the postprandial lipid responses of obese patients, these are closely associated with high fasting triglycerides (TG). This study of 17 normotriglyceridemic, normogluucose-tolerant android obese subjects (body mass index, BMI =  $34.3 \pm 3.1$  kg/m<sup>2</sup>) and 33 normal-weight controls (BMI =  $21.8 \pm 1.6$  kg/m<sup>2</sup>) was done to examine their postprandial responses to an oral fat loading test containing retinol (890 calories, 85% fat) and to evaluate the possible association between clinical and biological features of obesity and/or insulin resistance and postprandial lipemia.

**SUBJECTS AND MEASUREMENTS:** Blood samples were taken before giving the fat load and at 2,3,4,5,6 and 8 h after it. Insulin sensitivity was assessed using HOMA, and TG and retinyl palmitate (RP) in the plasma, chylomicrons and non-chylomicron fractions were measured each time.

**RESULTS:** The areas under the curves (AUC) of chylomicron TG for the obese and controls were not different, indicating adequate lipolytic activity. By contrast, the AUC for non-chylomicron TG was significantly greater in the obese than in the controls ( $512 \pm 135$  vs  $429 \pm 141$  mmol/l min,  $P < 0.01$ ). In addition, the AUC for RP in this same fraction was significantly lower in the obese than in the controls ( $103 \pm 55$  vs  $157 \pm 88$  mg/l min,  $P < 0.05$ ), suggesting that the TG from endogenous lipoproteins accounted for most of the increase in TG in the non chylomicron fraction. Parameters related to obesity showed no relationship with these postprandial abnormalities, whereas HOMA, which discriminated between the groups, partly explained ( $r^2 = 23\%$ ,  $P < 0.01$ ) the significant increase in non-chylomicron TG.

**CONCLUSIONS:** Android obese patients with a fasting TG in the normal range and not different from the fasting TG of lean controls had an abnormal postprandial lipemia response, indicated by a significantly greater TG in the non-chylomicron subfraction than in controls. These alterations may be partly due to postprandial changes in endogenous lipoproteins as a consequence of insulin resistance.

*International Journal of Obesity* (2000) 24, 468–478

**Keywords:** postprandial lipemia; obesity; insulin resistance; oral fat load; retinyl palmitate; triglyceride-rich lipoproteins

## Introduction

Atherosclerosis is a major cause of morbidity and death in affluent countries and postprandial lipoprotein metabolism is likely to be involved in atherogenesis, as first suggested by Zilversmit.<sup>1</sup> Several studies have described abnormalities in postprandial metabolism in patients with coronary artery disease,<sup>2–4</sup> and shown that postprandial triglycerides (TG) are independent predictors of coronary artery disease in multivariate analysis,<sup>5</sup> even after adjustment for fasting TG or HDL-cholesterol in normolipidemic men.<sup>6</sup>

Obesity is associated with abnormal fasting lipid

parameters such as increased fasting triglyceride and decreased HDL-cholesterol,<sup>7</sup> which could explain, at least in part, the greater development of cardiovascular disease in obese people. Nevertheless, obesity appears to be an independent risk factor for coronary artery disease, even in subjects with normal fasting plasma lipids and normal glucose tolerance.<sup>8</sup> Some studies have reported altered postprandial lipemia in obese patients,<sup>9,10</sup> but little is known about postprandial lipid metabolism in normolipidemic and normogluucose tolerant obese patients.

Liver-derived triglyceride-rich lipoproteins have recently been suggested to be important in the postprandial lipemia alterations in patients with coronary heart disease.<sup>11</sup> In obese patients, these alterations could be due mainly to increased postprandial VLDL production<sup>9,10</sup> or to a defect in the clearance of intestinal or hepatic TG-rich lipoproteins.<sup>12</sup> The decreased insulin sensitivity commonly associated with obesity<sup>13</sup> and the abdominal distribution of fat<sup>14</sup> may well play an important part. Some published

\*Correspondence: B Guerci, Diabétologie, Maladies Métaboliques et Maladies de la Nutrition, Centre d'Investigation Clinique-Inserm/CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, BP 303, 54201 Toul, France.

E-mail: b.guerci@chu-nancy.fr

Received 20 May 1999; revised 14 October 1999; accepted 15 November 1999



reports indicate that hyperinsulinemia and/or decreased insulin sensitivity is involved in altered postprandial lipemia,<sup>15-17</sup> while other authors found no association between an exaggerated postprandial TG response and the features of insulin resistance.<sup>18</sup>

However, most of these studies were done on obese patients with dyslipidemia or with significantly higher triglycerides than in controls (parameters known to influence postprandial state,<sup>9,16,19-21</sup>) making it difficult to evaluate the influences of obesity and lipid parameters on postprandial lipemia. The impact of insulin resistance on postprandial metabolism remains to be analyzed independently of other parameters known to influence postprandial metabolism.

Therefore, the present study was conducted on obese patients with normoglycose tolerance and normal fasting lipid concentrations that were not different from those of normal weight healthy controls to examine the postprandial response to an oral fat loading test and to evaluate the possible association between clinical and biological features of obesity and/or insulin resistance and postprandial lipemia.

## Materials and methods

### Patients and controls

A group of 17 obese patients (five men, 12 women) and 33 normal weight controls (21 men, 12 women) were recruited. All had a normal glucose tolerance (fasting plasma glucose ( $t_{0\text{min}}$ ) < 6.1 mmol/l and 2 h-plasma glucose ( $t_{120\text{min}}$ ) < 7.8 mmol/l after an oral glucose tolerance test) and fasting lipid levels (triglyceride < 1.70 mmol/l, HDL-cholesterol > 0.90 mmol/l for men, and 1.03 mmol/l for women, and LDL-cholesterol < 4.13 mmol/l).

Android obese patients were selected according to the following criteria: (1) body mass index (BMI) was used as an index of adiposity, obesity was defined by a BMI above 30 kg/m<sup>2</sup>; (2) abdominal (android) fat distribution was defined by a waist-to-hip ratio (WHR) over 0.85 for women, and over 0.95 for men; (3) none of the patients was morbidly obese. Healthy subjects were selected according to the following criteria: BMI 18–25 kg/m<sup>2</sup> and stable body weight (less than 2% change in the last 3 months).

All the participants (obese and control) also had no symptoms of illness, no family history of premature coronary disease (before 60 y), and normal profiles for blood creatinine, sodium, potassium, chloride, total protein, total and direct bilirubin, and aspartate (AST), alanine (ALT) amino-transferase, and gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ GT) activities. None of them had any endocrine or gastrointestinal disease, renal failure, hypertension (systolic blood pressure < 140 mmHg, diastolic blood pressure < 90 mmHg), or was a regular smoker (cigarette smoking was defined as the consumption of more than 10 cigarettes daily for at

least 5 y). The participants claimed to have stopped smoking 7 days before the study. None of the participants (obese or controls) was on any medication known to affect carbohydrate or lipoprotein metabolism, and their alcohol intake was limited (below 20 g/day). All the women were premenopausal (in follicular cycle) and none of them was taking oral contraceptive or hormone replacement therapy. This project was approved by the local Ethics Committee of the Nancy University Hospital (France) and all subjects gave their written informed consent.

### Dietary assessments

A 7-day dietary record, including a week-end and 5 weekdays, was used to determine the subjects usual energy intakes and proportion of fats, carbohydrates and proteins. A weight maintenance diet was prescribed for all subjects (50% carbohydrate, 33% fat (P/S ratio 80%) and 17% protein) for the 7 days before the study to ensure uniformity.

Three days prior to the oral fat load test (OFLT), they were instructed to maintain their usual level of activity and to refrain from any strenuous exercise, to limit the influence of acute exercise, which alters lipid metabolism.<sup>22,23</sup> For the same reason, alcohol was not allowed during the 3 days immediately prior to OFLT.<sup>24,25</sup> The day before the fat load test, controls and obese patients were admitted at 20:00 h to the Clinical Research Center for a calibrated meal corresponding to step 1 of the National Cholesterol Education Program<sup>26</sup> (690 calories, with 31% fat, 19% protein and 50% carbohydrate). They remained fasted for 12 h until 08:00 h, when the oral fat load was given.

### Oral fat load test

The fat load consisted of 180 g of a blended emulsified meal containing 3.5% dry skimmed milk, 19.25% butter, 23.75% peanut oil, 22% chocolate, 30.25% water, 0.75% gelatin, 0.25% sorbic acid and 0.25% potassium sorbate (Laboratoires Pierre Fabre Santé, Castres, France). It provided 890 calories (85% fat, 13% carbohydrates, 2% protein) and contained 88 mg cholesterol, 35 g saturated fatty acid, 30 g mono- and 15 g poly-unsaturated fatty acid. The fatty acid composition of the OFLT was determined by gas chromatography. The OFLT contained 1.25% of the total fatty acids as 10:0, 1.5% as 12:0, 3.1% as 14:0, 20.3% as 16:0, 12.3% as 18:0, 43.7% as 18:1, 13.3% as 18:2 and 1.08% as 20:0. Oral vitamin A (100,000 UI retinyl ester) was added to the fat load (Avibon<sup>®</sup> 50 000 UI Theraplix, Rhone Poulenc Rorer, Paris, France) and was used to label intestinally derived lipoproteins. The fat load was ingested in 15 min, with 200 mL water. No further food or drink were allowed during the study period. The participants were instructed to remain in bed, in a supine position.





### Laboratory procedures

Total cholesterol and triglycerides were measured enzymatically (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). HDL-cholesterol was assessed by phosphotungstic acid precipitation and LDL-cholesterol was calculated according to the Friedewald formula.<sup>27</sup> HDL2- and HDL3-cholesterol concentrations were determined by nondenaturing electrophoresis in discontinuous-gradient gels.<sup>28</sup> Apo A1 and apoB were determined by immuno-nephelometry with commercial kits (Beckman, Gagny, France). Free fatty acids (FFA) were measured by enzymatic assay using Wako kits (Unipath, Dardilly, France). Plasma glucose was determined enzymatically (bioMérieux, PAP 250, Marcy l'Etoile, France). Total plasma insulin concentration was determined by immuno-enzymatic assay (Insulin IMX<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Tokyo, Japan). Cross-reactivity with pro-insulin was below 0.05%

Retinyl palmitate (RP) was measured by reverse-phase high performance liquid chromatography (System Gold, Beckman), according to De Ruyter *et al.*<sup>29</sup> The detection limit was 0.018 mg/l. Although we recognize the limitations of retinyl esters as specific markers of chylomicrons and chylomicron remnants,<sup>30,31</sup> the RP levels serve as useful estimates of the intestinally derived component of postprandial lipemia.<sup>32</sup>

The apo E genotypes were determined using *Hha* I restriction enzyme and the polymerase chain reaction (PCR).<sup>33</sup>

Fasting plasma leptin concentrations were measured in triplicate by radioimmunoassay (Kit, LINCO Research Inc. St Louis, MO, USA). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4.5% and 8%, respectively.

Insulin sensitivity was assessed from blood samples collected 30, 20 and 10 min before the ingestion of the oral fat load using the homeostasis model assessment (HOMA) system described by Matthews *et al.*<sup>34</sup> with the formula (insulin mU/l  $\times$  plasma glucose mmol/l) / 22.5.

### Collection of sequential blood samples

A 21 gauge venous canula was inserted into an antecubital vein 30 min prior to the fat load. Blood samples were then taken, 30, 20 and 10 min before the fat load and 2, 3, 4, 5, 6 and 8 h later (T0, T2, T3, T4, T5, T6 and T8). Plasma glucose and insulin concentrations were assessed at T0 and T2. The apo E genotype, apo A1 and apo B, plasma total LDL- and HDL-cholesterol, HDL2- and HDL3-cholesterol concentrations were determined to T0. Samples (15 ml) of blood were collected in vacutainer tubes at all times from T0 to T8. The tubes contained a final concentration of 0.15% EDTA for measuring TG in the plasma, chylomicron and non-chylomicron fractions, and RP in the plasma and non-chylomicron fraction. All blood

samples were immediately centrifuged at 1000g for 15 min, at 4°C. Phenylmethylsulfonyl fluoride (10 mmol/l, dissolved in isopropanol) and aprotinin (Trasylol<sup>®</sup>, Bayer Pharma, Puteaux, France) were immediately added to the plasma to final concentrations of 10 and 28  $\mu$ mol/l, respectively. A lipoprotein fraction (supernatant) containing predominantly chylomicrons (Svedberg flotation, Sf > 400) was isolated by ultracentrifugation for 30 min at 25,000 rpm (100,000g) in a Beckman XL-80 ultracentrifuge, rotor Ti-SW 41 (Palo Alto, CA, USA). The infranatant was collected and named the non-chylomicron fraction (Svedberg flotation, Sf < 400), which contained triglyceride-rich lipoproteins (chylomicron remnants, very low density lipoproteins (VLDL) and VLDL remnants). Mean recovery ( $\pm$  s.d.) was  $98 \pm 3\%$  for TG. Triglycerides in the plasma and fractions were assayed the same day and aliquots of plasma and non-chylomicron fraction were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed for RP. The RP content of the chylomicron fraction was calculated as the difference between total plasma and non-chylomicron RP.

### Statistical analysis

Data are means  $\pm$  s.d. When the distribution of a variable was not normal, as assessed by skewness and kurtosis tests, data were log-transformed, and statistical analysis was performed on the log-transformed data. The chi-squared test was used to compare the distributions of apoE genotype in the obese and control groups. The areas under the time concentration curves (area under curves: AUCs) were calculated by the trapezoidal method.<sup>35</sup> Incremental AUC (AUCi) was evaluated after subtracting the initial individual values (T0) for triglyceride from all respective postprandial measurements, yielding the net postprandial change.

Repeated-measures ANOVA was used to assess the differences in the postprandial TG and RP concentrations between groups. When ANOVA was significant, or when variables were measured only once, means were compared between groups by Student's unpaired *t*-test. Data were compared by the Mann-Whitney *U*-test for two matched groups, or when men and women were analyzed separately. A regression test was used to test univariate correlations between continuous variables. Analysis of covariance was performed to define significant variables to be included into the models of stepwise regression analysis. Non-Gaussian variables were log transformed before multiple linear regression analysis to identify significant independent predictors of postprandial lipemia parameters. Significance was implied at  $P < 0.05$ . StatView<sup>®</sup> software (Abacus Concepts Inc., StatView V, Brain Power, Calabasas, CA) was used for all calculations.



## Results

### Characteristics and lipid concentrations of obese patients and controls

The clinical and biological characteristics of the obese patients and controls, men and women separately, are shown in Table 1. As expected, the body weight, waist circumference and waist-to-hip ratio of men were higher than for women in each group. Leptin concentrations were significantly (4-fold) elevated in obese patients, and leptin levels were higher in women than in men in each group. HOMA levels were higher in obese men and obese women than in controls. The fasting lipid and lipoprotein concentrations are shown in Table 2. Triglyceride concentrations remained

within the normal range, although they were slightly but not significantly higher in the obese than in controls. Although HDL-cholesterol was in the normal range (according to the selection criteria), HDL and HDL2-cholesterol levels were significantly lower in obese patients than in controls ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ). HDL2 levels were lowest in obese men and significantly lower than in obese women ( $P < 0.05$ ). The distributions of apo E isoforms between obese and controls were similar. No subject was homozygous for the apo E2 isoform.

### Postprandial lipid responses in obese patients and controls

The OFLT was well-tolerated. No subject suffered from nausea or reported any adverse reactions. We

**Table 1** Clinical characteristics of 33 controls and 17 obese patients, according to gender

	Control (n = 33)		Obese (n = 17)	
	Men (21)	Women (12)	Men (5)	Women (12)
Age (y)	26.7 ± 8.2	36.7 ± 7.1 <sup>a</sup>	48.6 ± 9.6 <sup>b</sup>	38.4 ± 6.9 <sup>a</sup>
Weight (kg)	68.9 ± 6.3	58.7 ± 9.5 <sup>a</sup>	110.1 ± 14.6 <sup>b</sup>	89.5 ± 8.5 <sup>a,c</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 ± 1.3	21.2 ± 1.9	34.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	34.4 ± 3.7 <sup>c</sup>
Body surface area (m <sup>2</sup> )	1.84 ± 0.11	1.65 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.23 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.09 <sup>a,c</sup>
Fat/Body surface area (g/m <sup>2</sup> )	43.6 ± 2.6	48.9 ± 4.9 <sup>a</sup>	35.4 ± 3.8 <sup>b</sup>	41.4 ± 2.1 <sup>a,c</sup>
Waist circumference (cm)	77.6 ± 6.2	70.0 ± 6.7 <sup>a</sup>	118.4 ± 5.8 <sup>b</sup>	105.3 ± 7.9 <sup>a,c</sup>
Waist/hip ratio	0.84 ± 0.06	0.76 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.04 <sup>a,c</sup>
Physical activity (h/week)	4.2 ± 3.9	1.7 ± 2.1	2.6 ± 0.9	0.9 ± 0.9 <sup>a</sup>
OGTT, t <sub>0min</sub>				
Plasma glucose (mmol/l)	4.54 ± 0.46	4.36 ± 0.49	6.05 ± 1.02 <sup>b</sup>	5.59 ± 0.57 <sup>c</sup>
Plasma insulin (pmol/l)	35.9 ± 16.5	27.3 ± 11.8	50.3 ± 4.9	74.4 ± 25.9 <sup>c</sup>
OGTT, t <sub>120min</sub>				
Plasma glucose (mmol/l)	4.16 ± 1.04	4.31 ± 0.99	6.35 ± 0.87 <sup>b</sup>	6.55 ± 0.84 <sup>c</sup>
Plasma insulin (pmol/l)	123.2 ± 85.5	139.4 ± 87.8	310.9 ± 272.3	529.7 ± 384.8 <sup>c</sup>
HOMA	1.17 ± 0.47	0.99 ± 0.32	1.96 ± 0.83 <sup>b</sup>	2.93 ± 1.22 <sup>c</sup>
Leptin (ng/ml)	3.5 ± 1.8	8.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	13.3 ± 2.4 <sup>b</sup>	33.2 ± 15.2 <sup>a,c</sup>

Data are means ± s.d. Mann-Whitney *U*-test was used for statistical analysis.

<sup>a</sup>Significant value ( $P < 0.05-0.001$ ) was used to compare values for men and women in obese and control groups. <sup>b</sup> $P < 0.05-0.0001$  obese men vs control men; <sup>c</sup> $P < 0.01-0.0001$  obese women vs control women. BMI = body mass index; OGTT = oral glucose tolerance test; HOMA (blood samples taken 30, 20 and 10 min before the fat load) = homeostasis model assessment.

**Table 2** Biological characteristics of 33 controls and 17 obese patients, separated according to the gender

	Control (n = 33)		Obese (n = 17)	
	Men (21)	Women (12)	Men (5)	Women (12)
Cholesterol (mmol/l)	4.27 ± 0.86	4.67 ± 0.68	4.66 ± 0.66	4.63 ± 0.77
Triglycerides (mmol/l)	0.75 ± 0.22	0.79 ± 0.42	0.91 ± 0.26	0.94 ± 0.23
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.24 ± 0.23	1.28 ± 0.20	1.04 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.28 <sup>c</sup>
HDL 2-cholesterol (mmol/l)	0.46 ± 0.19	0.59 ± 0.16	0.26 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.16 <sup>a,c</sup>
HDL 3-cholesterol (mmol/l)	0.78 ± 0.14	0.70 ± 0.13	0.78 ± 0.10	0.76 ± 0.15
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.69 ± 0.76	3.03 ± 0.50	3.20 ± 0.49	3.10 ± 0.65
Apo A1 (g/l)	1.29 ± 0.20	1.35 ± 0.18	1.15 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.27 <sup>c</sup>
Apo B (g/l)	0.68 ± 0.18	0.74 ± 0.10	0.77 ± 0.10	0.79 ± 0.18
Lp(a) (g/l)	0.17 ± 0.22	0.22 ± 0.32	0.06 ± 0.04	0.24 ± 0.29
	(0.01-0.82)	(0.02-1.11)	(0.02-0.10)	(0.01-0.95)
Apo E genotype (n)				
ε2/3	1	4	1	1
ε3/3	16	4 <sup>a</sup>	4	6
ε2/4	0	1	0	0
ε3/4	4	3	0	5

Data are means ± s.d. (for Lp(a); range in brackets). Mann-Whitney *U*-test was used for statistical analysis.

<sup>a</sup>Significant value ( $P < 0.05-0.01$ ) was used to compare values for men and women obese and control groups. <sup>b</sup> $P < 0.05-0.01$  obese men vs control men; <sup>c</sup> $P < 0.05-0.01$  obese women vs control women. HDL = high density lipoproteins; LDL = low density lipoproteins; Apo = apolipoprotein; Lp(a) = lipoprotein(a).



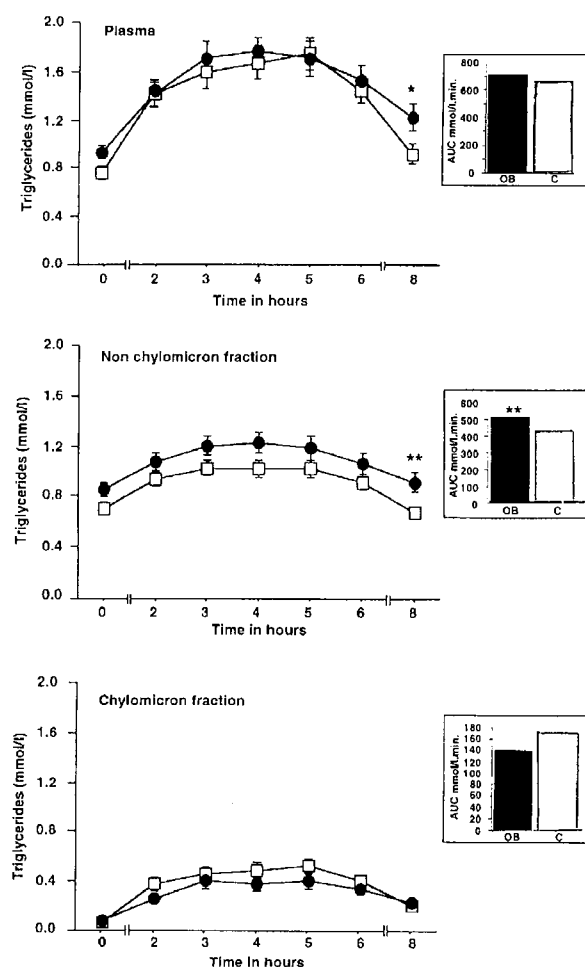
found no difference between men and women in obese and control groups for any of the postprandial parameters studied (Table 3). Therefore, the data for men and women may be pooled.

**Postprandial triglyceride responses (Figure 1).** The peak plasma triglyceride concentrations in obese patients and controls were not significantly different (obese:  $1.76 \pm 0.47$  mmol/l; controls:  $1.74 \pm 0.76$  mmol/l) and peak times were similar (obese:  $4.3 \pm 1.6$  h; controls:  $4.5 \pm 1.3$  h, NS). The total area under the plasma triglyceride curve was greater in the obese group than in controls, but the difference was not statistically significant ( $705 \pm 176$  vs  $659 \pm 229$  mmol/l/min). The plasma TG concentrations tended to return to initial values in the control group after 8 h ( $0.92 \pm 0.43$  vs  $0.76 \pm 0.31$  mmol/l, NS), whereas they remained elevated in the obese group ( $1.22 \pm 0.45$  vs  $0.93 \pm 0.22$  mmol/l,  $P < 0.01$ ) and significantly higher than in controls ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the chylomicron TG of the two groups. The AUC of non chylomicron TG was, however, significantly greater in obese patients than in controls ( $512 \pm 135$  vs  $429 \pm 141$  mmol/l/min,  $P < 0.01$ ; Figure 1). The TG in the non chylomicron subfraction remained significantly higher in obese subjects than in controls at T8 ( $0.91 \pm 0.33$  vs  $0.67 \pm 0.26$  mmol/l,  $P < 0.01$ ). The plasma total cholesterol and apo B of the controls and obese were not significantly different and did not change significantly during the OFLT (data not shown).

The incremental AUC for triglycerides in plasma (obese:  $259 \pm 104$  mmol/l/min, and controls:  $292 \pm 187$  mmol/l/min), chylomicron (obese:  $109 \pm 52$  mmol/l/min; and controls:  $147 \pm 73$  mmol/l/min) and non chylomicron (obese:  $108 \pm 66$  mmol/l/min; and controls:  $93 \pm 108$  mmol/l/min) fractions did not differ between controls and obese patients.

**Postprandial retinyl palmitate responses (Figure 2).** Figure 2 shows the curves for retinyl palmitate in the plasma and subfractions for the two groups. We found

no difference in the AUC chylomicron RP of the two groups. The AUCs for plasma RP and non chylomicron RP were significantly higher in controls than in obese ( $301 \pm 153$  vs  $217 \pm 92$  mg/l/min;  $P < 0.05$ ; and



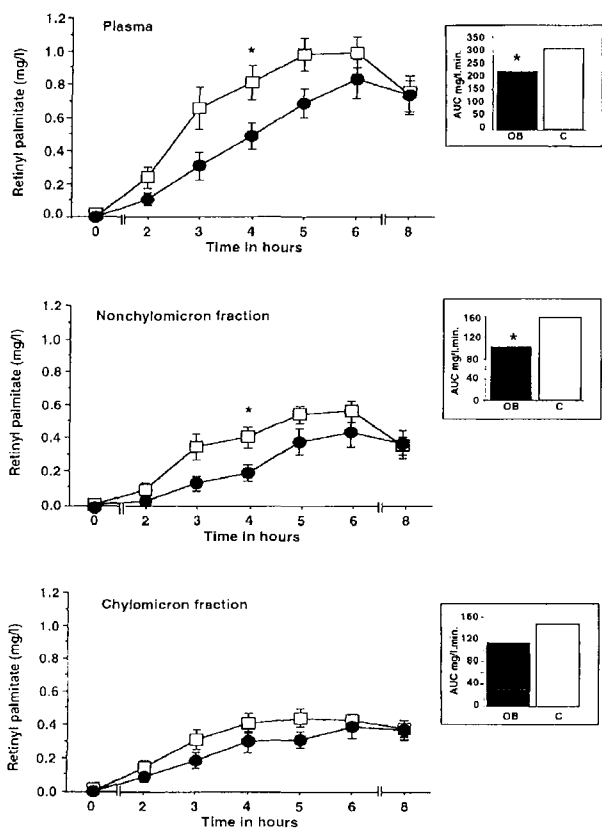
**Figure 1** Plasma postprandial triglyceride for 17 obese patients (●—●) and 33 controls (□—□) at baseline and for 8 h after ingestion of the test meal at T0. Values are means  $\pm$  s.e.m. Inserts: area under the curves (AUC) of the response obtained after the oral fat load test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  obese patients (OB) vs controls (C).

**Table 3** Peak values, areas under the curves and later postprandial lipid parameters, separated according to gender

	Control (n = 33)		Obese (n = 17)	
	Men (21)	Women (12)	Men (5)	Women (12)
Plasma TG at T8 (mmol/l)	$0.96 \pm 0.44$	$0.87 \pm 0.42$	$1.04 \pm 0.45$	$1.29 \pm 0.45^b$
CM TG at T8 (mmol/l)	$0.22 \pm 0.18$	$0.15 \pm 0.10$	$0.18 \pm 0.10$	$0.25 \pm 0.14$
Non-CM TG at T8 (mmol/l)	$0.66 \pm 0.26$	$0.67 \pm 0.27$	$0.85 \pm 0.42$	$0.94 \pm 0.29^b$
AUC plasma TG (mmol/l.min.)	$651 \pm 217$	$675 \pm 259$	$750 \pm 208$	$687 \pm 168$
AUC CM TG (mmol/l.min.)	$168 \pm 75$	$179 \pm 83$	$166 \pm 53$	$130 \pm 59$
AUC non-CM TG (mmol/l.min.)	$414 \pm 113$	$458 \pm 183$	$532 \pm 190^a$	$504 \pm 115^c$
AUC plasma RP (mg/l.min.)	$304 \pm 178$	$296 \pm 103$	$250 \pm 71$	$204 \pm 100^b$
AUC CM RP (mg/l.min.)	$147 \pm 96$	$148 \pm 63$	$164 \pm 59$	$97 \pm 52^c$
AUC non-CM RP (mg/l.min.)	$161 \pm 103$	$150 \pm 61$	$97 \pm 43$	$106 \pm 61^b$

Data are means  $\pm$  s.d. Mann-Whitney U-test was used for statistical analysis.

<sup>a</sup> $P < 0.10$  obese men vs control men; <sup>b</sup> $P < 0.05$  and <sup>c</sup> $P < 0.10$  obese women vs control women. TG = triglyceride; RP = retinyl palmitate; CM = chylomicron.



**Figure 2** Plasma postprandial retinyl palmitate for 17 obese patients (●—●) and 33 controls (□—□) at baseline and for 8 h after ingestion of the test meal at T0. Values are means  $\pm$  s.e.m. Inserts: area under the curves (AUC) of the response obtained after the oral fat load test. \* $P < 0.05$  obese patients (OB) vs controls (C).

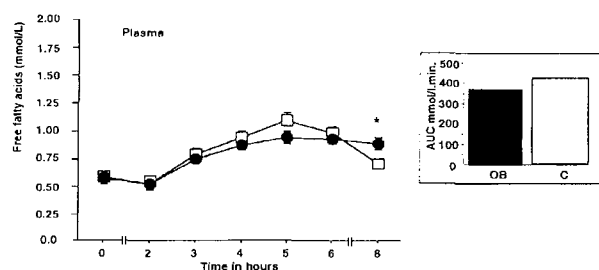
$157 \pm 88$  vs  $103 \pm 55$  mg/l min,  $P < 0.05$ , respectively). The RP concentrations of all fractions in the two groups were not different at T8. The AUCs of TG and retinyl palmitate were closely correlated in the plasma ( $r = 0.51$ ,  $P < 0.0001$ ) and chylomicron fraction ( $r = 0.55$ ,  $P < 0.0001$ ).

The same trend in the TG and RP differences (AUCs and late time points) between controls and obese patients was observed when men and women were analyzed separately, but it was more pronounced for women than for men (Table 3).

**Postprandial free fatty acids (FFA) and insulin responses.** The fasting free fatty acid concentrations at T0 in the obese and control subjects were not different. In the postprandial state, FFA decreased slightly and non significantly 2 h after the test meal to the same extent in both groups (Figure 3). The plasma FFA concentrations in controls increased and then returned to close to fasting values at T8 ( $0.74 \pm 0.20$  vs  $0.59 \pm 0.26$  mmol/l,  $P < 0.01$ ). The

### Postprandial lipemia in the normotriglyceridemic obese

B Guerci et al



**Figure 3** Plasma postprandial free fatty acids for 17 obese patients (●—●) and 33 controls (□—□) at baseline and for 8 h after ingestion of the test meal at T0. Values are means  $\pm$  s.e.m. Inserts: area under the curves (AUC) of the response obtained after the oral fat load test. \* $P < 0.05$  obese patients (OB) vs controls (C).

plasma FFA concentrations in obese patients remained stable from T4 to T6, with FFA levels at T8 ( $0.89 \pm 0.21$  mmol/l) which were significantly higher than the fasting values ( $0.58 \pm 0.16$  mmol/l,  $P < 0.0001$ ), or the FFA levels in the control group ( $0.89 \pm 0.21$  vs  $0.74 \pm 0.20$  mmol/l,  $P < 0.05$ ). The AUCs for FFA for the two groups were not significantly different ( $423 \pm 136$  vs  $375 \pm 64$  mmol/l min, NS).

The plasma insulin levels at T0 were significantly higher in the obese patients ( $76.7 \pm 25.7$  pmol/l) than in controls ( $39.6 \pm 19.5$  pmol/l,  $P < 0.0001$ ). The post OFLT plasma insulin levels increased significantly in both groups, and returned below baseline at T8. The AUCs for plasma insulin were significantly greater in obese patients ( $41,945 \pm 14,810$  pmol/l min) than in controls ( $20,461 \pm 6274$  pmol/l min,  $P < 0.0001$ ).

### Correlation coefficients

Univariate analyses were carried out for the postprandial lipid parameters which were significantly different between obese and controls. Table 4 shows simple correlation coefficients between non chylomicron fraction metabolism during the postprandial period (as reflected by AUC-TG or -RP), and clinical, anthropometric, lipidic and insulin resistance parameters. The AUC of the non chylomicron TG was highly correlated with the log plasma triglyceride concentration at baseline. It was also positively correlated with age, BMI, waist circumference, log leptin, total and LDL-cholesterol, apo B, log plasma insulin at  $t_{120\text{min}}$  (OGTT) and log HOMA, but negatively with HDL 2-cholesterol. By contrast, the AUC of non chylomicron RP displayed a very weak negative correlation with BMI and a positive correlation with total cholesterol. Finally, the log AUC plasma RP was not correlated with any of the parameters.

### Stepwise regression analysis

Two models of multivariate analysis were developed by stepwise regression (Table 5). Analyses are shown for the overall independent variables (model 1) and

**Table 4** Correlation coefficients (*r*) between triglyceride or retinyl palmitate AUCs in the non-chylomicron fraction and relevant anthropometric and clinical parameters

	AUC non-CM TG		AUC non-CM RP	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Age	0.43	< 0.01	-0.11	NS
BMI	0.28	< 0.05	-0.26	< 0.10
Waist circumference	0.39	< 0.01	-0.20	NS
Log leptin	0.40	< 0.01	-0.11	NS
Log plasma triglyceride T0	0.69	< 0.0001	0.05	NS
HDL2-cholesterol	-0.28	< 0.05	0.15	NS
Total cholesterol	0.34	< 0.05	0.26	< 0.10
LDL-cholesterol	0.35	< 0.05	0.22	NS
ApoB	0.40	< 0.01	0.17	NS
Log plasma insulin $t_{120\text{min}}$	0.39	< 0.01	-0.07	NS
Log HOMA	0.44	< 0.01	-0.06	NS

AUC = area under the curve; CM = chylomicron; TG = triglyceride; RP = retinyl palmitate; BMI = body mass index; HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein; Apo = apolipoprotein; HOMA = homeostasis model assessment.

for the clinical characteristics of obesity and insulin resistance (model 2). Analysis of covariance was also performed, leading to exclusion of waist circumference, total cholesterol and LDL cholesterol from the stepwise regression analysis, because these variables were highly statistically correlated ( $r > 0.85$ ). Plasma TG at baseline, age, BMI, log HOMA, HDL 2, apo B, log leptin and log plasma insulin  $t_{120\text{min}}$  (OGTT) are the independent variables in model 1. Plasma TG at baseline predicted 50% and age 11% of the variance of the log AUC non chylomicron TG. Since plasma triglycerides are closely correlated with postprandial lipemia, we excluded plasma triglyceride, apo B and HDL 2 at baseline from model 2. Log HOMA and age both significantly predicted the AUC non chylomicron TG, and accounted for 23% (log HOMA) and 12% (age) of the variance of log AUC non chylomicron TG.

When subjects were matched for age and sex, there was no difference for physical activity between the

two groups. Fourteen obese (five men, nine women) and 14 healthy controls (5 men, nine women) were studied. We found that AUC non chylomicron TG was significantly higher in obese patients than in controls ( $513 \pm 143$  vs  $427 \pm 89$  mmol/l min,  $P < 0.05$ ) and that the AUCs of plasma and non chylomicron RP were both significantly lower in obese patients ( $204 \pm 93$  vs  $283 \pm 83$  mg/l min, and  $98 \pm 67$  vs  $155 \pm 54$  mg/l min, respectively,  $P < 0.05$ ), confirming the data for the whole group. The second model of the stepwise regression analysis remained valid for matched groups, indicating that log HOMA significantly predicted 29% of the variance of the log AUC non chylomicron TG.

## Discussion

We have detected abnormalities in the postprandial responses of normotriglyceridemic obese subjects to a fat load challenge, even though these subjects displayed no significant degree of hyperlipemia in the fasted state.

The AUC for chylomicron TG was no greater in the obese than in controls, and the chylomicron TG even tended to be lower at all time-points, indicating adequate lipolytic activity. By contrast, the AUC for non chylomicron TG was significantly greater in the obese than in controls, but the AUC for RP in this same fraction and in plasma were smaller in the obese than in controls. The late time-points of postprandial triglycerides in plasma and non chylomicron fraction were higher in obese patients than in controls. We found no difference between men and women in each group of controls and obese. However, there were too few obese men to rule out a potential statistical difference in postprandial responses between men and women.

**Table 5** Stepwise regression analysis of the relationship between postprandial triglyceride responses and significant independent variables

Dependent variable	Independent variables	Regression model change in R2 (%)	Standardized estimate	<i>P</i>
Model 1 AUC non-CM TG	Plasma TG T0	50	0.66	< 0.0001
	Age	61	0.33	< 0.01
	BMI	—	—	< 0.10
	Log HOMA	—	—	< 0.10
	HDL-2	—	—	NS
	ApoB	—	—	NS
	Log leptin	—	—	NS
	Log plasma insulin $t_{120\text{min}}$	—	—	NS
Model 2 AUC non-CM TG	Log HOMA	23	0.42	< 0.01
	Age	35	0.36	< 0.01
	BMI	—	—	NS
	Log leptin	—	—	NS
	Log plasma insulin $t_{120\text{min}}$	—	—	NS

AUC = area under the curve; CM = chylomicron; TG = triglyceride; BMI = body mass index; HOMA = homeostasis model assessment; HDL = high density lipoprotein; Apo = apolipoprotein.



The triglyceride oral ingestion in different studies ranges from 20 to 120 g of fat.<sup>36</sup> We have not adjusted the fat intake of our OFLT for body surface area, as in other studies.<sup>12,16,37</sup> Women were therefore presumably given much more fat per body surface area than were men, which may explain why their postprandial responses did not differ from those of men. However, this relative fat intake is close to the lower limit of 50 g/body surface area given in many other studies,<sup>6,11</sup> suggesting that women did not exceed their postprandial TG-rich lipoproteins clearance capabilities.<sup>38</sup> In contrast, the obese patients had a relatively low dose of the test meal per unit of body surface area, but there were postprandial differences between obese patients and controls that would probably be more marked if we had given fat intake adjusted for body surface area. This may indicate the importance of standardizing the fat test, without adjusting for any clinical or biological parameters.<sup>39</sup>

Obesity has detrimental effects on the metabolic profile<sup>7</sup> and several studies have evaluated the impact of obesity on postprandial lipid responses.<sup>9,12,17</sup> In contrast to our results, two studies reported that the total area under the triglyceride curve and peak plasma triglyceride concentrations were significantly higher in obese patients.<sup>9,17</sup> However, they studied massively obese individuals, with average BMIs of 38.3 and 44 kg/m<sup>2</sup>, and significantly higher fasting plasma TG levels than the lean control subjects.

Our first model of stepwise regression analysis demonstrates that fasting plasma triglycerides and age are correlated with the AUC for non chylomicron TG and explains 50% (TG) and 11% (age) of the variance of this parameter. The correlation between fasting TG and the AUC for non chylomicron TG was expected, since the incremental AUCs for this fraction in the groups were not different.<sup>40</sup> This result is consistent with the previously described association between fasting TG and postprandial lipemia response.<sup>5,17,21</sup> This study is the first, to our knowledge, which compares healthy controls and obese patients with fasting triglyceride levels within the normal range, and not significantly different in the two groups. Thus, the fasting triglyceride level appears to be a rather poor parameter for discriminating between controls and obese patients with altered postprandial lipemia in routine clinical practice. This is in accordance with those reported by Schrezenmeir *et al*,<sup>15</sup> who demonstrated that the plasma fasting TG level is very specific, but rather insensitive (47%) for predicting postprandial lipemia responses. Studies on the size and composition of fasting VLDL subfractions and their relationship with postprandial lipemia could be more informative.

The chylomicron and non chylomicron fractions provide interesting informations. First, there are no differences between the groups for TG and RP in the chylomicron fraction. These data suggest that the metabolism of chylomicron was not altered in our obese population with normal glucose tolerance and

normal fasting lipid parameters in the early stages of insulin resistance. This has recently been suggested by Mekki *et al*,<sup>12</sup> who found no alteration of triglycerides concentrations in apo B48 TRLs in gynoid normolipidemic obese women.

The second finding is the discrepancy between the TG and RP in the non chylomicron fraction; the RP concentrations were significantly lower and the TG concentrations were significantly higher in this fraction in normolipidemic obese patients than in controls. Although RP is a marker of intestinal TG-rich lipoproteins, several authors have detected small amounts of RP in lipoproteins of hepatic origin.<sup>41,42</sup> This RP fraction is of greater significance at later postprandial times (above 8 h), suggesting that it is derived from the transfer between plasma lipoproteins.<sup>41,42</sup> Therefore, other authors consider this transfer to be quantitatively nonsignificant.<sup>43–45</sup> Under our conditions (last sample time 8 h), the concentration of RP in the non chylomicron fraction, which contained TRL (chylomicron remnants, VLDL, VLDL remnants), can be considered to be predominantly derived from the remnants of chylomicrons.

The postprandial non chylomicron RP response (AUC) was lower for obese subjects than for the controls suggesting that the clearance of chylomicron remnants was normal or even increased in obese patients. In contrast, the levels of triglycerides in the non chylomicron fraction are greater for obese subjects than for controls. As the lipolytic response for the chylomicron and chylomicron remnants is considered to be normal, the increased TG in the non chylomicron fraction suggests increased TGs from the liver.

We therefore propose that TG from endogenous TG-rich lipoproteins, presumably VLDL particles, accounts for most of the postprandial increase in TG in the non chylomicron fraction in the normolipidemic obese group. This has been evoked by others for hypertriglyceridemic obesities,<sup>9,10</sup> the offspring of parents with early coronary artery disease,<sup>46</sup> and in normolipidemic men with coronary heart disease.<sup>11</sup> More recently, Vansant *et al*<sup>17</sup> reported higher plasma TG and lower plasma RP concentrations in obese normolipidemic women during postprandial lipemia, suggesting that a significant portion of the postprandial TG response is due to endogenous hepatic lipoproteins. However, lipid subfractions were not analyzed and the postulate was not confirmed.

The mechanism responsible for a postprandial increase in the concentration of endogenous hepatic lipoproteins is not clear. Decreased catabolism and/or increased hepatic synthesis of TG-rich lipoproteins could contribute to this phenomenon. Postprandial VLDL clearance might be delayed because of competition for lipoprotein lipase (LPL) between chylomicrons and VLDL. The LPL on the surface of capillary endothelial cells acts preferentially on large chylomicrons, thereby causing an increase in the residence time of VLDL in the blood.<sup>47</sup>

Another explanation could be the synthesis of TG triggered by an increased flux of FFAs to the liver, supplying it with substrates which stimulate hepatic VLDL-TG secretion. Our normolipidemic obese and control subjects showed no significant differences in postabsorptive and postprandial FFA concentrations during the first 6 h, confirming the data of Binnert *et al.*<sup>48</sup> Only the FFA levels were significantly higher in the obese group than in the controls at T8. These higher late postprandial concentrations could lead, at least in part, to increased hepatic synthesis and secretion of VLDL particles in the postprandial state, as suggested by Couillard *et al.*,<sup>10</sup> for subjects with high visceral adipose tissue. The lipolysis of stored triglycerides is poorly inhibited by insulin in insulin resistance, resulting in an increased flux of FFAs to the liver,<sup>49-52</sup> as occurred at the later postprandial times in the obese group. The hydrolysis of chylomicrons by LPL may also contribute to the increased flux of FFA to the liver in the postprandial state, as demonstrated by Frayn.<sup>53</sup>

Finally, an increase in endogenous hepatic lipoprotein production could occur in insulin resistance because the hepatic VLDL production is poorly inhibited by insulin in this situation, whereas the clearance of endogenous lipoproteins may not yet be altered by insulin resistance. It has been recently shown that acute hyperinsulinemia does not suppress hepatic VLDL production in obese subjects,<sup>54</sup> or in type 2 diabetic patients.<sup>55</sup> This may also contribute to the postprandial increase in TG in the non chylomicron fraction.

In accordance with the role of insulin resistance in postprandial lipemia, our second statistical model of stepwise regression showed that HOMA predicted 23% of the variation in the AUC for non chylomicron TG. We found similar results when obese patients were matched with controls for sex and age, suggesting that the insulin resistance has an impact on altered postprandial lipemia, independently of other parameters known to influence the postprandial state, such as age and fasting lipid levels.<sup>56</sup> A previous study demonstrated the role of insulin resistance in altered postprandial lipemia, but the authors did not analyze obesity parameters and insulin resistance separately.<sup>15</sup> Another study on obese women has recently reported that insulin resistance is an independent determinant of postprandial hypertriglyceridemia, but without analyzing subfractions of triglyceride-rich lipoproteins.<sup>17</sup>

We found no relationship between parameters related to obesity (BMI, waist-to-hip ratio and leptin levels) and any parameters of the postprandial lipemia. This result suggests that obesity *per se* has little influence on postprandial lipemia compared with insulin resistance. This is in accordance with studies which found no influence of body fatness (measured on simple parameters such as BMI or waist-to-hip ratio) on postprandial lipemia.<sup>17</sup> However, when the fat distribution was more precisely studied, some

authors found that subjects with increased abdominal fat distribution, and therefore potentially more insulin resistance,<sup>14</sup> had altered postprandial lipemia.<sup>10,17,57</sup>

In conclusion, we have made a special effort to recruit android obese patients with a fasting TG in the normal range and not different from the fasting TG of lean controls. These obese patients had an abnormal postprandial lipemia response, indicated by a significantly greater TG in the non chylomicron subfraction than in controls. These potentially atherogenic alterations may be partly due to postprandial changes in endogenous lipoproteins as a consequence of insulin resistance. Hence, the fasting plasma TG is not as informative in the early stages of insulin resistance caused by obesity as in other diseases, highlighting the usefulness of oral fat load tests for unmasking abnormalities of lipid metabolism.

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministère de la Santé et de la Solidarité Nationale: Projet Hospitalier de Recherche Clinique 1994. Experimental oral fat loads were supplied by Laboratoires Pierre Fabre Santé, Castres, France. We thank the staff of the Centre d'Investigation Clinique du CHU de Nancy for their clinical help and the staff of the Broussais Hospital for their technical assistance. We also thank Dr Anik Girard-Globa for her constructive criticism during the preparation of this manuscript. Dr Owen Parkes checked the English text.

#### References

- Zilverman DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979; **60**: 473-485.
- Nikkila M, Solakivi T, Lehtimäki T, Koivula T, Laippala P, Astrom B. Postprandial plasma lipoprotein changes in relation to apolipoprotein E phenotypes and low density lipoprotein size in men with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1994; **106**: 149-157.
- Groot PHE, Van Stiphout WAHJ, Krauss XH, Jansen H, Van Tol A, Van Ramshorst E, Chin-On S, Hofman A, Cresswell SR, Havekes L. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; **11**: 653-662.
- Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, Pringle S, Maclean J, Lorimer AR, Bonnefous F, Bogaievsky Y, Packard CJ, Shepherd J. Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1990; **85**: 193-202.
- Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, Mühlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto AM, Patsch W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1992; **12**: 1336-1345.
- Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Iaina A. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *Br Med J* 1996; **312**: 935-939.
- Després JP. Dyslipidemia and obesity. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1994; **8**: 629-660.
- Hubert HB, Feinlieb MD, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26 year follow-up of participants in the Framingham study. *Circulation* 1983; **67**: 968-976.



- 9 Lewis GF, O'meara NM, Soltys PA, Blackman JD, Iverius PH, Druetzier AF, Getz GS, Polonsky KS. Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **71**: 1041–1050.
- 10 Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriège P, Després JP. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 1998; **47**: 953–960.
- 11 Karpe F, Hellénus ML, Hamsten A. Differences in postprandial concentrations of very-low-density lipoprotein and chylomicron remnants between normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic men with and without coronary heart disease. *Metabolism* 1999; **48**: 301–307.
- 12 Mekki N, Christofilis MA, Charbonnier M, Atlan-Gepner C, Defoort C, Juhel C, Borel P, Portugal H, Pauli AM, Vialettes B, Lairon D. Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 184–191.
- 13 Campbell PJ, Gerich JE. Impact of obesity on insulin action in volunteers with normal glucose tolerance: demonstration of a threshold for the adverse effect of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **70**: 1114–1118.
- 14 Kissebah AH. Insulin resistance in visceral obesity. *Int J Obes* 1991; **15**: 109–115.
- 15 Schrezenmeir J, Keppler I, Fenselau S, Weber P, Biesalski HK, Probst R, Laue Ch, Zuchhold HD, Prellwitz W, Beyer J. The phenomenon of a high triglyceride response to an oral lipid load in healthy subjects and its link to the metabolic syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1993; **683**: 302–314.
- 16 Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhou MY, Coulston AM, Jones C, Chen YDI, Reaven GM. Relation between insulin resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma lipoprotein lipase activity, and postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 320–324.
- 17 Vansant G, Mertens A, Muls E. Determinants of postprandial lipemia in obese women. *Int J Obes* 1999; **23**: 14–21.
- 18 Byrne CD, Wareham NJ, Phillips DIW, Hales CN, Martensz ND. Is an exaggerated postprandial triglyceride response associated with the component features of the insulin resistance syndrome? *Diabetic Med* 1997; **14**: 942–950.
- 19 Patsch JR, Karlin JB, Scott LW, Smith LC, Gotto AM. Inverse relationship between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1449–1453.
- 20 Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Patsch W. High density lipoprotein<sub>2</sub>: relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Clin Invest* 1987; **80**: 341–347.
- 21 O'meara NM, Lewis GF, Cabana VG, Iverius PH, Getz GS, Polonsky KS. Role of basal triglyceride and high density lipoprotein in determination of postprandial lipid and lipoprotein responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **75**: 465–471.
- 22 Aldred HE, Perry IC, Hardman AE. The effect of a single bout of brisk walking on postprandial lipemia in normolipidemic young adults. *Metabolism* 1994; **43**: 836–841.
- 23 Foger B, Patsch JR. Exercise and postprandial lipaemia. *J Cardiovasc Risk* 1995; **2**: 316–322.
- 24 Pownall HJ. Dietary ethanol is associated with reduced lipolysis of intestinally derived lipoproteins. *J Lipid Res* 1994; **35**: 2105–2113.
- 25 Hartung GH, Lawrence SJ, Reeves RS, Foreyt JP. Effect of alcohol and exercise on postprandial lipemia and triglyceride clearance in men. *Atherosclerosis* 1993; **100**: 33–40.
- 26 Grundy SM. National Cholesterol Education Program: second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation* 1994; **89**: 1329–1445.
- 27 Friedewald WT, Levy RI, Frederickson J. Estimation of the concentration of low-density cholesterol in plasma without the use of the preparative ultra-centrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**: 499–502.
- 28 Atger V, Malon D, Bertièrre MC, N'Diaye F, Girard-Globa A. Cholesterol distribution between high-density-subfractions HDL2 and HDL3 determined in serum by discontinuous gradient gel electrophoresis. *Clin Chem* 1991; **37**: 1149–1152.
- 29 De Ruyter MGM, De Leenheer AP. Simultaneous determination of retinol and retinyl esters in serum or plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1978; **24**: 1920–1924.
- 30 Krasinski SD, Cohn JS, Russell RM, Schaefer EJ. Postprandial plasma vitamin A metabolism in humans: a reassessment of the use of plasma retinyl esters as markers for intestinally derived chylomicrons and their remnants. *Metabolism* 1990; **39**: 357–365.
- 31 Karpe F, Hamsten A. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipid* 1995; **6**: 123–129.
- 32 Syväne M, Talmud PJ, Humphries SE, Fisher RM, Rosseneu M, Hilden H, Taskinen MR. Determinants of postprandial lipemia in men with coronary artery disease and low levels of HDL cholesterol. *J Lipid Res* 1997; **38**: 1463–1472.
- 33 Clavel C, Durlach V, Birembaut P. Rapid and safe determination of human apolipoprotein E genotypes by miniaturised SDS-PAGE in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 295–299.
- 34 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostatis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–419.
- 35 Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royton P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 1990; **300**: 230–235.
- 36 Karpe F. Effects of diet on postprandial lipemia: a suggestion for methodological standardization. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1997; **7**: 44–55.
- 37 Durlach V, Attia N, Zahouani A, Leutenegger M, Girard-Globa A. Postprandial cholesteryl ester transfer and high density lipoprotein composition in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients. *Atherosclerosis* 1996; **120**: 155–165.
- 38 Westerveld HT, Kock LAW, Van Rijn HJM, Erkelens DW, De Bruin TWA. 17b-estradiol improves postprandial lipid metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 249–253.
- 39 Hadjadj S, Paul JL, Meyer L, Durlach V, Vergès B, Ziegler O, Drouin P, Guerci B. Delayed changes in postprandial lipid in young normolipidemic men after a nocturnal vitamin A oral fat load test. *J Nutr* 1999; **129**: 1649–1655.
- 40 Castro Cabezas M, De Bruin TWA, Jansen H, Kock LAW, Kortlandt W, Erkelens DW. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1993; **13**: 804–814.
- 41 Cohn JS, Johnson EJ, Millar JS, Cohn SD, Milne RW, Marcel YL, Russell RM, Schaefer EJ. Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters. *J Lipid Res* 1993; **34**: 2033–2040.
- 42 Karpe F, Bell M, Björkegren J, Hamsten A. Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 199–207.
- 43 Wilson DE, Chan IF, Ball M. Plasma lipoprotein retinoids after vitamin A feeding in normal man: minimal appearance of retinyl esters among low-density lipoproteins. *Metabolism* 1983; **32**: 514–517.



- 44 Berr F, Kern F. Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. *J Lipid Res* 1984; **25**: 805–812.
- 45 Lemieux S, Fontani R, Uffelman KD, Lewis GF, Steiner G. Apolipoprotein B-48 and retinyl palmitate are not equivalent markers of postprandial intestinal lipoproteins. *J Lipid Res* 1998; **39**: 1964–1971.
- 46 Slyper AH, Zvereva S, Schectman G, Hoffmann RG, Pleuss J, Walker JA. Normal postprandial lipemia and chylomicron clearance in offspring of parents with early coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 1106–1113.
- 47 Havel RJ. Postprandial lipid metabolism: an overview. *Proc Nutr Soc* 1997; **56**: 659–666.
- 48 Binnert C, Pachiardi C, Beylot M, Hans D, Vandermader J, Chantre P, Riou JP, Laville M. Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium-chain triacylglycerols. *Am J Clin Nutr* 1998; **67**: 595–601.
- 49 Roust LR, Jensen MD. Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity. *Diabetes* 1993; **42**: 1567–1573.
- 50 Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int J Obes* 1998; **22**: 414–423.
- 51 Groop LC, Bonadonna RC, Simonson DC, Petrides AS, Shank M, DeFronzo RA. Effect of insulin on oxidative and non-oxidative pathways of free fatty acid metabolism in human obesity. *Am J Physiol* 1992; **263**: 79–84.
- 52 Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E, DeFronzo RA. The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; **72**: 96–107.
- 53 Frayn KN. Non-esterified fatty acid metabolism and postprandial lipaemia. *Atherosclerosis* 1998; **141**: 41–46.
- 54 Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* 1993; **42**: 833–842.
- 55 Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; **40**: 454–462.
- 56 Guerci B, Vergès B, Paul JL, Dousset B, Durlach V. Relationship between insulin resistance, leptin and postprandial lipemia responses in normal and overweight patients [Abstract]. *Diabetes* 1997; **46** (Suppl 1): 234.
- 57 Ryu JE, Craven TE, Mac-Arthur RD, Hinson WH, Bond MG, Hagaman AP, Crouse JR. Relationship of intraabdominal fat as measured by magnetic resonance imaging to postprandial lipemia in middle-aged subjects. *Am J Clin Nutr* 1994; **60**: 586–591.

## CLINICAL STUDY

## No acute response of leptin to an oral fat load in obese patients and during circadian rhythm in healthy controls

Bruno Guerci, Samy Hadjadj, Didier Quilliot, Olivier Ziegler and Pierre Drouin

Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Maladies de la Nutrition, Centre d'Investigation Clinique CIC/INSERM, CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, 54201 Toul cedex, BP 303, France

(Correspondence should be addressed to B Guerci, Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Maladies de la Nutrition, Centre d'Investigation Clinique CIC/INSERM, CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, 54201 Toul cedex, BP 303, France; Email: b.guerci@chu-nancy.fr)  
(B Guerci and S Hadjadj contributed equally to this work)

### Abstract

This study was done to elucidate the relationship between postprandial leptin and obesity, and the possible influence of the circadian rhythm on the dynamic leptin response to an oral fat load (OFLT). In *experiment 1*, we measured the leptin and insulin responses to an oral fat load in 16 non-diabetic obese subjects and in 16 healthy controls, matched for age and gender. In *experiment 2*, we measured the leptin and insulin responses to an OFLT according to the time of fat load ingestion: 0700 h (diurnal (D) test) or 2200 h (nocturnal (N) test) in nine normal-weight healthy males. Baseline leptin concentration was correlated with the body mass index, body fat mass and percentage of body fat mass in both experiments. The leptin concentrations were higher in women than in men ( $P < 0.001$ ). In *experiment 1*, the leptin concentrations were higher in obese subjects than in controls, but did not change over time in either group. The plasma insulin concentrations at baseline and during the postprandial state, as well as the area under the curve (AUC) of insulin, were higher in obese subjects than in controls ( $P < 0.05 - 0.0001$ ). There was no correlation between postprandial insulin responses and postprandial leptin responses in either obese or control groups. In *experiment 2*, leptin (D vs N,  $2.9 \pm 1.4$  vs  $2.9 \pm 1.0$  ng/ml) and insulin (D vs N,  $41 \pm 18$  vs  $25 \pm 9$  pmol/l) concentrations were similar at the beginning of the D and N tests after a 10 h fast. The leptin concentrations did not change after D or N tests and were not statistically different for D and N tests. Our results indicate that the leptin concentration in healthy controls and in obese patients is not acutely influenced by a high fat load.

European Journal of Endocrinology 143 649–655

### Introduction

Obesity is particularly frequent in western countries, with a prevalence of 15% in men and 20% in women aged 35–64 years in Europe (1, 2). The consumption of high-fat diets leads to increased energy intake, weight gain and obesity in humans (3), but the mechanisms by which increases in dietary fat lead to weight gain are not well understood. Leptin, the product of the *ob* gene, has a major impact on obesity. Animal studies indicate that leptin is involved in the control of food intake (4–6). The influence of leptin on energy intake in humans is supported by data on leptin-deficient subjects (7). The plasma leptin concentration is also influenced by chronic food intake (8), but little information is available on acute leptin regulation by different meals. Recently, it was demonstrated that the leptin concentrations in healthy subjects dropped after an oral glucose tolerance

test, or 2 h after a mixed meal (9). High-fat meals reduce 24 h circulating leptin concentrations more than do low-fat meals in healthy women (10), suggesting that leptin plays a role in the development of obesity induced by fat consumption. But no information is available on obese patients, and the acute relationship between obesity and the postprandial leptin response to an oral fatty meal remains to be determined.

Leptin secretion follows a circadian rhythm (11), with circulating leptin concentrations being high around midnight and low in the morning (12). These variations are linked to the pattern of meal eating, as suggested by meal shift experiments. The nocturnal leptin concentration has been negatively correlated with the risk to gaining weight (13), making the dynamic response to leptin an attractive field of research for factors influencing obesity. But no information is available on the effect of identical meals given

for breakfast (morning) or for dinner (evening), when subjects fasted for similar times before the test meal.

We performed two studies on the leptin responses to an oral fat load. The first examined the postprandial leptin responses of obese patients and normal-weight controls to an oral fat load. The second examined the postprandial leptin responses of normal-weight subjects to oral fat loads given at different times (diurnal at 0700 h or nocturnal at 2200 h).

## Subjects and methods

### Subjects

**Experiment 1** We studied the 8 h postprandial leptin response to an oral fat load in 16 obese patients (4 men, 12 women) and 16 normal-weight controls (4 men, 12 women) recruited in the Clinical Research Center, Nancy (France). They were all normal on physical examination, had normal glucose tolerance (fasting plasma glucose < 6.1 mmol/l and 2 h plasma glucose < 7.8 mmol/l assessed by a 75 g oral glucose tolerance test) and no dyslipidemia in fasting blood sample (LDL cholesterol < 4.13 mmol/l, triglyceride < 1.70 mmol/l, and HDL cholesterol > 0.90 mmol/l for men or > 1.03 mmol/l for women). Patients and controls were matched for gender and age ( $\pm 3$  years). All the women were premenopausal, with normal menstrual cycles and no subject was taking any medication.

**Experiment 2** The postprandial leptin response of nine healthy male volunteers was studied for 8 h after an oral fat load administered at 0700 h (diurnal test, D) or at 2200 h (nocturnal test, N). All subjects underwent two consecutive oral fat load tests. Each subject served as his own control. The time between the two tests was  $14 \pm 1$  days. Nocturnal and diurnal tests were performed in a random order. Five subjects started with the D test and four with the N test.

Body mass index (BMI) was used as an index of adiposity. Obesity was defined by a BMI above  $30 \text{ kg/m}^2$ , and normal-weight by a BMI of  $18\text{--}24.9 \text{ kg/m}^2$ . Body weight was stable for obese and control subjects (less than 2% change in the previous 3 months). Abdominal (android) fat distribution was defined by a waist-to-hip ratio (WHR) of over 0.85 for women, and over 0.95 for men. Body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) with a Lunar DPX-L machine (Lunar, Madison, WI, USA).

This project was approved by the local ethics committee of the Nancy University Hospital (France) and all subjects gave their written informed consent.

### Oral fat load test (OFLT)

In both experiments, subjects spent at least 12 h in our Clinical Research Center before beginning the OFLT. They were instructed to refrain from strenuous exercise and

alcohol for 3 days prior to the OFLT. The subjects were given a calibrated meal corresponding to step 1 of the National Cholesterol Education Program (14) (690 Cal with 31% fat, 19% protein and 50% carbohydrate) at 2030 h on the day before the diurnal fat load. They fasted for 10 h, until 0800 h, at which time the diurnal oral fat load was given. In *experiment 2*, subjects were given the same calibrated meal at 2030 h on the day before the diurnal test and at 1130 h on the morning before taking the nocturnal fat load. They fasted for 10 h, until 2200 h, when the nocturnal fat load was given.

The fat load test was performed 2 weeks after the inclusion oral glucose challenge. The fat load was 180 g of a manufactured emulsified blended meal composed of 3.5% dried skimmed milk, 19.25% butter, 23.75% peanut oil, 22% chocolate, 30.25% water, 0.75% gelatin, 0.25% sorbic acid and 0.25% potassium sorbide (Laboratoire Pierre Fabre Santé, Castres, France). Its energy content was (15): 890 Cal (85% fat, 13% carbohydrates, 2% protein), with 35 g saturated fatty acid, 30 g mono-unsaturated fatty acid, 15 g poly-unsaturated fatty acid and 88 mg cholesterol. The fat load was ingested over 15 min., with 200 ml water. No further food or drink were allowed during the study. The participants remained supine and slept normally for the whole nocturnal test. They were instructed to remain in bed, supine, for the diurnal test.

### Biochemical measurements

A 21 gauge indwelling venous canula was inserted into an antecubital vein 30 min prior to the fat load. Blood samples (15 ml) were then taken 30, 20 and 10 min before the fat load, to determine baseline insulin and glucose concentrations. The mean of the three values was considered. Blood samples were then taken immediately before the fat load and 2, 4, 6 and 8 h later (here designated  $t_0$ ,  $t_2$ ,  $t_4$ ,  $t_6$ ,  $t_8$ ) to determine leptin and insulin concentrations. All blood samples were collected in vacutainer tubes and immediately centrifuged at  $1000 \text{ g}$  for 15 min, at  $4^\circ \text{C}$ . The tubes for measuring triglyceride in plasma contained a final concentration of 0.15% EDTA.

Total cholesterol and triglyceride concentrations were measured enzymatically (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). HDL cholesterol was assessed by phosphotungstic acid precipitation and LDL cholesterol was calculated according to the Friedewald formula (16). Plasma glucose was determined enzymatically (bioMérieux, PAP 250, Marcy l'Etoile, France). Total plasma insulin concentration was determined by immuno-enzymatic assay (Insulin IMX®, Abbott Laboratories, Tokyo, Japan). Cross-reactivity with pro-insulin was below 0.05%. Fasting plasma leptin concentrations were measured in triplicate by radio-immunoassay kit (LINCO Research Inc., St Louis, MO, USA). The intra- and interassay coefficients of variation were 4.5 and 8%, respectively.

**Table 1** Clinical characteristics of the obese patients and controls at inclusion.

	Experiment 1		P value*	Experiment 2
	Obese (n = 16)	Controls (n = 16)		Controls (n = 9)
Age (years)	40±7	38±7	NS	22±3
Sex (male/female)	4/12	4/12	NS	9/0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.4±3.2	21.5±2.2	<0.0001	22.4±0.9
Fat mass (kg)	38.8±6.3	18.6±3.1	<0.001	9.6±2.7
Fat mass (%)	41.7±5.2	28.7±4.6	<0.01	14.0±4.0
Waist circumference (cm)	108±9	73±9	<0.0001	77±3
Waist/hip ratio	0.94±0.06	0.80±0.09	<0.001	0.83±0.03

\*Student's unpaired *t*-test between obese and control subjects for experiment 1. NS, not significant.

Insulin sensitivity was assessed from blood samples collected 30, 20 and 10 min before the ingestion of the OFLT using the homeostasis model assessment (HOMA) system described by Matthews *et al.* (17) with the formula:  $([\text{insulin}] \times \text{plasma} [\text{glucose}]) / 22.5$ , where [insulin] is expressed in mU/l and plasma [glucose] in mmol/l.

### Statistical analysis

Data are presented as means ± s.d. When the distribution of a variable was not normal, as assessed by skewness and kurtosis tests, data were log-transformed before statistical analysis was performed. Area under the time-dependent concentration curve (area under curves, AUC) was calculated by the trapezoidal rule (18). Two-way repeated-measures ANOVA was used to assess the effect of postprandial times on postprandial lipids, leptin and insulin concentrations. ANOVA was used with sample time and obesity status (*experiment 1*) or diurnal/nocturnal test (*experiment 2*) as factors affecting lipids, leptin or insulin concentrations. When ANOVA was significant, or when variables were measured only once, means were compared using Student's unpaired (*experiment 1*) or paired (*experiment 2*) *t*-test. The association between two continuous variables was determined by the linear regression coefficient. The level of significance was implied at  $P < 0.05$ . StatView® software (Abacus Concepts Inc.,

StatView V; Brain Power, Calabasas, CA, USA) was used for all calculations. To better clarify the illustrations, the data in the figures are shown as means ± s.e.m.

### Results

The clinical characteristics at inclusion and the laboratory data at baseline of the subjects are summarized in Tables 1 and 2.

#### Experiment 1

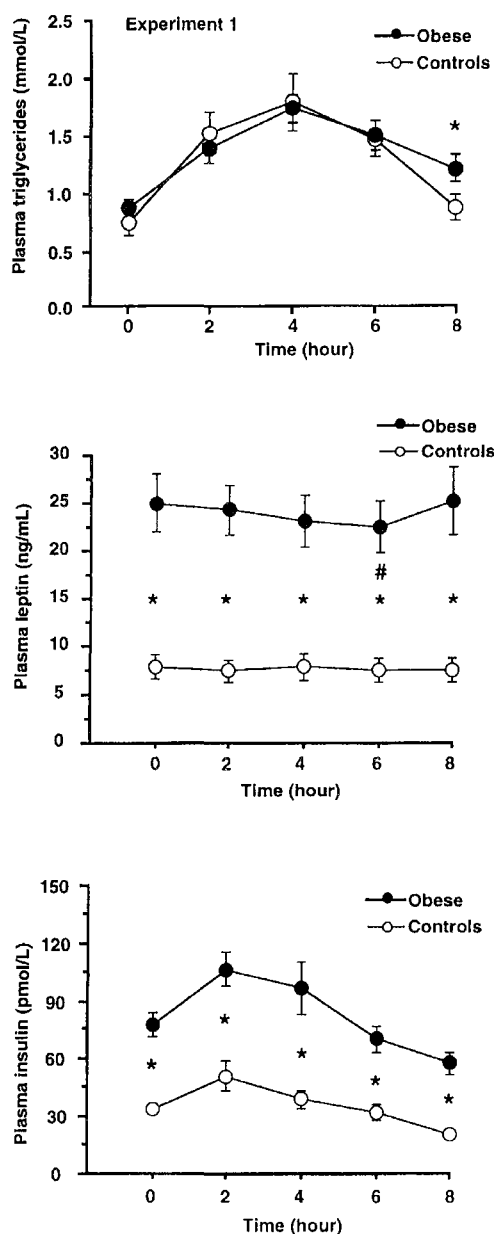
Sexual dimorphism was evidenced by two-factor ANOVA ( $F = 17.24$ ,  $P = 0.001$ ), independent of the weight status (interaction between weight status and leptin at  $t_0$ :  $F = 4.91$ ,  $P = 0.05$ ). Obese and control women had significantly higher leptin values ( $29.6 \pm 9.9$  and  $9.0 \pm 4.8$  ng/ml, respectively) than obese and control men ( $11.2 \pm 4.6$  and  $3.4 \pm 1.5$  ng/ml, respectively) ( $P < 0.01$  and  $0.05$ , respectively). However, the ratio of fasting leptin to percentage of body fat mass was not statistically different between obese subjects ( $0.58 \pm 0.25$ ) and controls ( $0.34 \pm 0.16$ ,  $P = 0.21$ ).

A positive relationship was found between baseline leptin concentration ( $t_0$ ) and BMI ( $r = 0.72$ ,  $P < 0.0001$ ) and percentage of fat mass ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.01$ ). The correlation between leptin at  $t_0$  and the body fat mass was not statistically significant ( $r = 0.48$ ).

**Table 2** Baseline laboratory characteristics of the obese patients and controls in experiments 1 and 2.

	Experiment 1		P value*	Experiment 2
	Obese (n = 16)	Controls (n = 16)		Controls (n = 9)
Leptin (ng/ml)	25.0±12.0	7.6±4.9	<0.0001	4.7±3.1
Leptin/% fat mass ratio	0.58±0.25	0.34±0.16	NS	0.31±0.12
HOMA	2.72±1.18	0.95±0.37	<0.0001	1.34±0.45
Total cholesterol (mmol/l)	4.68±0.72	4.79±0.72	NS	4.05±0.79
Triglyceride (mmol/l)	0.93±0.23	0.79±0.37	NS	0.83±0.28
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.10±0.27	1.34±0.25	<0.05	1.16±0.21
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.16±0.61	3.09±0.58	NS	2.51±0.73

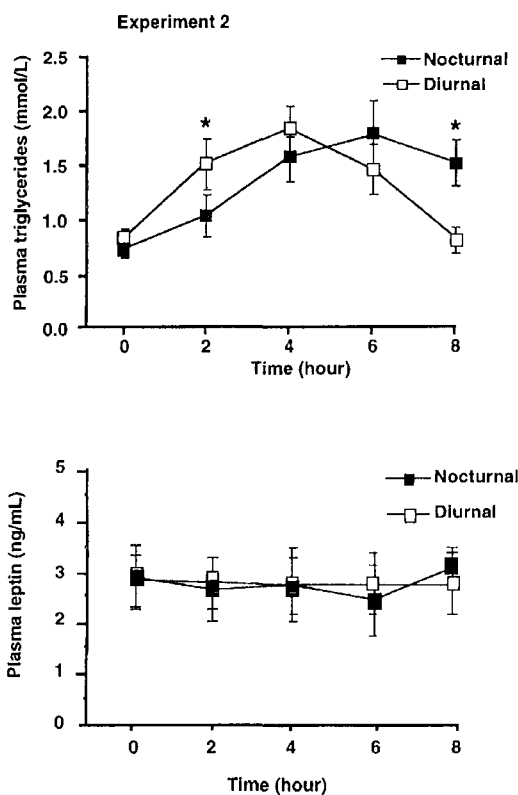
\*Student's unpaired *t*-test between obese and control subjects for experiment 1.



**Figure 1** Experiment 1: plasma postprandial triglyceride (upper panel), leptin (middle panel) and insulin (lower panel) concentrations for 16 obese patients (●) and 16 controls (○) at baseline and for 8 h after ingestion of the test meal at  $t_0$ . Values are shown as means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ ; obese patients vs controls;  $P < 0.05$  vs value at  $t_0$  in obese patients. Means were compared using Student's unpaired  $t$ -test.

$P = 0.052$ ). HOMA was also well correlated with the leptin levels at baseline ( $r = 0.68$ ,  $P < 0.001$ ).

The triglyceride (TG) response to the OFLT is illustrated in Fig. 1 (upper panel). The total areas under the plasma triglyceride curve were similar in the



**Figure 2** Experiment 2: plasma postprandial triglyceride (upper panel) and leptin (lower panel) responses in 9 healthy men at baseline and for 8 h after diurnal (□) and nocturnal (■) oral fat load tests. Values are shown as means  $\pm$  S.E.M. Means were compared using Student's paired  $t$ -test.

obese ( $696 \pm 178$  mmol/(l min)) and control groups ( $684 \pm 250$  mmol/(l min)). The plasma TG concentrations tended to return to initial values in the control group after 8 h ( $0.92 \pm 0.40$  vs  $0.79 \pm 0.37$  mmol/l,  $P = 0.29$ ), whereas they remained elevated in the obese group ( $1.24 \pm 0.46$  vs  $0.93 \pm 0.23$  mmol/l,  $P < 0.01$ ) and significantly higher than in controls ( $P < 0.05$ ).

The leptin and insulin responses to the OFLT are illustrated in Fig. 1 (middle and lower panels, respectively). The baseline leptin concentration in obese subjects ( $25.0 \pm 12.0$  ng/ml) was higher than in controls ( $7.6 \pm 4.9$  ng/ml,  $P < 0.0001$ ). The leptin concentrations did not change significantly over the postprandial time ( $F = 1.47$ ,  $P = 0.22$ ), and the interaction between sample time and obesity status was not significant ( $F = 1.29$ ;  $P = 0.28$ ), indicating that the postprandial leptin responses of obese patients and controls did not differ. Only the leptin concentration at  $t_6$  ( $22.5 \pm 10.3$  ng/ml) was lower than the fasting value in obese subjects ( $25.0 \pm 12.0$  ng/ml,  $P < 0.05$ ).

The postprandial insulin response was strongly influenced by obesity ( $F = 38.51$ ;  $P < 0.0001$ ) and the postprandial sample time ( $F = 16.77$ ,  $P < 0.0001$ ), but the interaction was not statistically significant ( $F = 1.58$ ,  $P = 0.18$ ), indicating that the postprandial insulin response curves were parallel and did not differ significantly for obese and controls. However, as expected, baseline insulin levels were significantly higher in obese patients ( $78 \pm 26$  pmol/l) than in controls ( $34 \pm 13$  pmol/l,  $P < 0.05$ ), as well as the AUCs of insulin ( $41\,969 \pm 15\,295$  vs  $18\,242 \pm 5081$  pmol/(l min),  $P < 0.0001$ ). The AUC of insulin was not significantly correlated with AUC of leptin in either obese ( $r = 0.34$ ;  $P = 0.20$ ) or in control subjects ( $r = 0.23$ ;  $P = 0.41$ ).

### Experiment 2

A positive correlation was found between baseline diurnal leptin ( $t_0$ ) and BMI ( $r = 0.76$ ,  $P = 0.05$ ), body fat mass ( $r = 0.85$ ,  $P = 0.01$ ) and percentage of body fat mass ( $r = 0.91$ ,  $P = 0.001$ ). A similar trend was observed with baseline nocturnal leptin, but the correlation was not significant ( $r = 0.68$ ,  $P = 0.06$ ;  $r = 0.69$ ,  $P = 0.057$ , for body fat mass and percentage of body fat mass, respectively). Therefore, HOMA was correlated with leptin levels at baseline, only in the morning ( $r = 0.72$ ,  $P = 0.02$ ), but not significantly in the night.

The total AUC for plasma triglyceride from the diurnal and nocturnal tests were similar. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of the interaction between the time of the fat load test administration and postprandial times on triglyceride concentrations ( $F = 5.03$ ,  $P < 0.0001$ ), indicating that the curves for plasma triglyceride concentrations after each test were significantly different (Fig. 2, upper panel). The triglyceride concentrations at  $t_2$  were higher in the diurnal test ( $1.51 \pm 0.69$  mmol/l) than in the nocturnal test ( $1.04 \pm 0.58$  mmol/l,  $P < 0.05$ ). But the triglyceride values at  $t_8$  were higher in the nocturnal test ( $1.52 \pm 0.63$  mmol/l) than in the diurnal test ( $0.82 \pm 0.34$  mmol/l,  $P < 0.05$ ).

The leptin responses to diurnal and nocturnal fat loads are illustrated in Fig. 2 (lower panel). Baseline leptin concentrations at 0700 h ( $2.9 \pm 1.4$  ng/ml) and 2200 h ( $2.9 \pm 1.0$  ng/ml,  $P = 0.58$ ) were not different. The leptin concentrations did not change significantly over the postprandial time ( $F = 0.78$ ;  $P = 0.55$ ), and the interaction between sample time and the time of fat load test administration (diurnal vs nocturnal) was not significant ( $F = 0.63$ ;  $P = 0.64$ ). The postprandial leptin concentrations were not different from the baseline leptin value, after either the diurnal or the nocturnal test.

The baseline insulin concentrations at 0700 h ( $41 \pm 18$  pmol/l) and 2200 h ( $25 \pm 9$  pmol/l,  $P = 0.28$ ) were not different. The curves for plasma insulin

concentrations after each test were similar (data not shown).

### Discussion

Our results show that there is no acute leptin response in the 8 h following an oral fat load in obese or control subjects, and that there appears to be no acute leptin change in normal-weight controls after a fat load test administered at 0700 h or at 2200 h. We also found no relationship between the postprandial insulin response and the leptin concentration. Our results for anthropometric characteristics are in good agreement with previous reports: we find a sexual dimorphism in the fasting leptin concentration, with higher values in women (19). We also find a correlation between fasting leptin and adiposity, as generally reported (20, 21). These results were found in obese as well as in healthy controls, but not significantly in healthy controls in the night.

Leptin, produced by adipose tissue, regulates adipose tissue mass, and circulating leptin levels are directly proportional to total adipose mass. Leptin concentration is also sensitive to caloric balance and influenced by chronic food intake: restriction of food intake leads to a drop in circulating leptin greater than that predicted by the reduction in adipose mass (8).

But there is little information available on acute leptin regulation by different meals. Our present findings indicate a lack of acute postprandial regulation of leptin by fat intake. This agrees with several studies (11, 21, 22). Some studies have shown that leptin levels do not increase after meals (21) or a glucose load (23). However, a recent study found that leptin concentrations dropped by  $8.8 \pm 4.4\%$  (9), confirming the study of Mohamed-Ali *et al.* (24), who showed that leptin levels remained unchanged 1 and 2 h after a high-carbohydrate meal, but increased after 3–5 h.

The effect of fat on leptin secretion is not well understood, particularly in obese patients, and the acute relationship between obesity and the postprandial leptin response to fat intake remains to be determined. In a recent study, Havel *et al.* showed that the postprandial leptin response of normal-weight women to a high fat meal reduces the nycthemeral leptin response more than a high-carbohydrate meal (10). This decrease in 24 h circulating leptin could contribute to the weight gain produced by the consumption of high-fat diets. Some authors have found no postprandial leptin response 3 h after a meal in healthy controls or obese patients (25). Our study was conducted over 8 h, and a high fat test was used (fat represented 85% of the caloric intake, which is best suited to discriminating the metabolic changes specifically due to the acute fat intake without interference from the effect of carbohydrate). The acute circulating leptin response to such a fatty meal has never been studied, particularly in obese subjects. We failed to demonstrate an acute regulation of leptin by fat intake

in obese subjects. A reason for the decrease in leptin concentration 6 h after the fat load in obese subjects is unclear. Although of small amplitude (about 10%), this postprandial decrease in leptin level 6 h after a fatty meal has not been previously reported, but could correspond to a decrease in leptin at 10.00 am in obese subjects (9, 12). Our results must be linked to the finding that changing the fat content of the diet has no effect on fasting leptin after a period of 7 days (20).

Two studies suggest that insulin is the signal that mediates the effect of caloric intake on leptin production (9, 24). In *experiment 1*, we find that the mean increase in insulin concentration after a fat load is modest in obese subjects (at  $t_2$   $107 \pm 34$  pmol/l) as well as in controls (at  $t_2$   $49 \pm 29$  pmol/l), well below the increases that induce a leptin response (26, 27). Saad *et al.* showed that the increase in leptin concentration during insulin infusion is 50% of the reference point for a plasma insulin concentration of  $138 \pm 36$  pmol/l (28). The change in leptin concentration was inversely related to plasma insulin concentration. It has also been demonstrated that leptin concentrations are increased only 6 h after an insulin infusion in normal subjects, and after 8.5 h in patients with type 2 diabetes mellitus (26). The lack of correlation in our study between insulin and leptin responses supports the lack of an acute regulation of leptin by insulin in physiological situations.

In *experiment 2*, the lack of difference in baseline leptin concentration between 0700 h and 2200 h is in apparent disagreement with those studies showing a peak in leptin concentration around midnight and a nadir around 10.00 h (12, 22, 29, 30). There is a nocturnal increase in leptin, however, which is related to the insulin response to meals. Leptin levels usually fall in the morning. But we gave a high-fat meal at the end of the day, after a fast similar to that experience at night to assess the effect of the meal itself on plasma leptin, independent of circadian changes in hormone secretion, i.e. cortisol levels. Consequently, we observed similar baseline levels of leptin whether in the morning or at night. This result is in agreement with the study of Schoeller *et al.* showing that a meal shift results in a shift in the leptin rise (12). In that study, the authors concluded that leptin rhythmicity was related to meal timing rather than light-dark cycle. The fast undergone by our subjects between 12.00 h and 2200 h was equivalent to a meal shift, and, the normal cumulative effect of the meals on the late evening leptin levels was thus lost. As the meal-related cumulative rise in insulin concentration is known to be the main factor determining the nocturnal increase in leptin (19), the lack of difference between diurnal and nocturnal basal leptin is not unexpected, as baseline insulin concentrations in the diurnal and nocturnal tests were not different. The nocturnal rise in leptin observed in other studies could be due only to the cumulative effect of the meals during the day (10, 11). Although Dallongeville *et al.* used a different test meal,

they also failed to find any difference between the postprandial response at different times of day (31).

The fact that the correlations between leptin and adiposity or HOMA observed for the diurnal test disappeared for the nocturnal test, suggests that other mechanisms, like the leptin pulse amplitude (32), could be involved in the regulation of leptin secretion during the day. The magnitude of the relative diurnal change in leptin has also been reported to be higher in lean men than in other lean or obese populations (19). In our small population of healthy men, we cannot exclude the influence of these regulations.

Our results thus provide evidence that fat intake is not linked to an acute change in postprandial leptin, and that the leptin concentration is not acutely influenced by an oral fat load. The lack of any relationship between obesity and the leptin response to an acute fat load makes it imperative to investigate further the regulatory process linking dietary fat intake and the development of obesity.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministère de la Santé et de la Solidarité Nationale: Projet Hospitalier de Recherche Clinique. Experimental oral fat loads were supplied by Laboratoires Pierre Fabre Santé, Castres, France. We thank the staff of the Centre d'Investigation Clinique du CHU de Nancy for their clinical and technical help. We thank Dr Owen Parkes for editing the English in this manuscript.

## References

- Seidell JC. Time trends in obesity: an epidemiological perspective. *Hormone and Metabolic Research* 1997 **29** 155–158.
- Vanitallie TB. Prevalence of obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1996 **25** 887–905.
- Lissner L & Heitmann BL. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *European Journal of Clinical Nutrition* 1995 **49** 79–90.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995 **269** 543–546.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R & Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995 **269** 546–549.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* 1995 **269** 540–543.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997 **387** 903–908.
- Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Openanova I, Nyce MR *et al.* Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans. *Diabetes* 1996 **45** 1511–1515.
- Panarotto D & Maheux P. Reduction of plasma leptin during a short-term fast, an oral glucose tolerance or a meal test can be a misleading bias in clinical studies. *Diabetologia* 1999 **42** 634.
- Havel PJ, Townsend R, Chaump L & Teff K. High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes* 1999 **48** 334–341.

- 11 Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S *et al.* Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1996 **97** 1344–1347.
- 12 Schoeller DA, Cella LK, Sinha MK & Caro JF. Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *Journal of Clinical Investigation* 1997 **100** 1882–1887.
- 13 Matkovic V, Ilich JZ, Badenhop NE, Skugor M, Clairmont A, Klisovic D *et al.* Gain in body fats is inversely related to the nocturnal rise in serum leptin level in young females. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997 **82** 1368–1372.
- 14 Grundy SM. National Cholesterol Education Program: second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation* 1994 **89** 1329–1445.
- 15 Hadjadj S, Paul JL, Meyer L, Durlach V, Vergès B, Ziegler O *et al.* Delayed changes in postprandial lipid in young normolipidemic men after a nocturnal vitamin A oral fat load test. *Journal of Nutrition* 1999 **129** 1649–1655.
- 16 Friedewald WT, Levy RI & Frederickson J. Estimation of the concentration of low-density cholesterol in plasma without the use of the preparative ultra-centrifuge. *Clinical Chemistry* 1972 **18** 499–502.
- 17 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985 **28** 412–419.
- 18 Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ & Royton P. Analysis of serial measurements in medical research. *British Medical Journal* 1990 **300** 230–235.
- 19 Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, Sharma A, Michael R, Jinagouda SD *et al.* Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998 **83** 453–459.
- 20 Schrauwen P, Van Marken Lichtenbelt WD, Westerterp KR & Saris WHM. Effect of diet composition on leptin concentration in lean subjects. *Metabolism* 1997 **46** 420–424.
- 21 Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 1996 **334** 292–295.
- 22 Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR & Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997 **82** 561–565.
- 23 Saad MF, Damani S, Gingrich RL, Riad-Gabriel M, Khan A, Boyadjian R *et al.* Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997 **82** 579–584.
- 24 Mohamed-Ali V, Goodrick SJ, Stanner SA, Rawesh A, Yudkin JS & Coppack SW. Adipose tissue leptin production at fasting and after a high carbohydrate meal (Abstract). *Diabetic Medicine* 1996 **13** S19.
- 25 Korbonsits M, Trainer PJ, Little JA, Edwards R, Kopelman PJ, Besser GM *et al.* Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clinical Endocrinology* 1997 **46** 751–757.
- 26 Malmström R, Taskinen MR, Karonen SL & Yki-Järvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996 **39** 993–996.
- 27 Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R *et al.* Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes* 1996 **45** 699–701.
- 28 Saad MF, Khan A, Sharma A, Michael R, Riad-Gabriel MG, Boyadjian R *et al.* Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 1998 **47** 544–549.
- 29 Haffner SM, Hancfeld M, Fischer S, Fückler K & Leonhardt W. Glibenclamide, but not acarbose, increases leptin concentrations parallel to changes in insulin in subjects with NIDDM. *Diabetes Care* 1997 **20** 1430–1434.
- 30 Pombo M, Herrera-Justiniano E, Considine RV, Hermida RC, Galvez MJ, Martin T *et al.* Nocturnal rise of leptin in normal prepubertal and pubertal children and in patients with perinatal stalk-transection syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997 **82** 2751–2754.
- 31 Dallongeville J, Hecquet B, Lebel P, Edmé JL, Le Fur C, Fruchart JC *et al.* Short term response of circulating leptin to feeding and fasting in man: influence of circadian cycle. *International Journal of Obesity* 1998 **22** 728–733.
- 32 Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong M-L, Bongiorno PB *et al.* Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998 **83** 4140–4147.

---

Received 04 December 1999

Accepted 29 June 2000



**ANALYSIS OF THE POSTPRANDIAL LIPID METABOLISM:  
USE OF A 3-POINT TEST  
(DIABETES METABOLISM, 2001, SOUS PRESSE)**

Bruno Guerci (1), Jean-Louis Paul (2), Samy Hadjadj (1), Vincent Durlach (3), Bruno Vergès (4), Nebil Attia (5), Anik Girard-Globa (5), Pierre Drouin (1)

(1) Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques & Maladies de la Nutrition, Centre d'Investigation Clinique/INSERM, CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, 54201 Toul cedex, B.P. 303, France

(2) Laboratoire de Biochimie. Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP. 75015 Paris et Faculté de Pharmacie Paris XI, 92296 Chatenay-Malabry, France

(3) Service d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques et Médecine Interne, U62, CHU de Reims, 51092 Reims, France

(4) Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques, CHU de Dijon, 21000 Dijon, France

(5) Laboratoire de la Fédération d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies de la Nutrition. Hôpital de l'Antiquaille, 1 rue de l'Antiquaille, 69005, Lyon, France

\* Correspondence and requests for reprints: Bruno Guerci, M.D.

Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques & Maladies de la Nutrition, Centre d'Investigation Clinique/INSERM, CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, 54201 TOUL cedex, B.P. 303, France

Tel: (33) 3 83 65 65 28

Fax: (33) 3 83 65 66 00

E-mail: [b.guerci@chu-nancy.fr](mailto:b.guerci@chu-nancy.fr)

# Diabetes & Metabolism

209

Rédacteur en Chef :

Professeur SERGE HALIMI

16 mars 2001

Adresse de correspondance :

Université de Grenoble  
Service d'Endocrinologie Diabétologie 11<sup>e</sup> étage  
17X

38000 GRENOBLE CEDEX

Téléphone : 04 76 76 58 12

Fax : 04 76 76 88 65

Monsieur le Dr B. Guerci

Service de Diabétologie, Mal. Métaboliques  
et Maladies de la Nutrition

Hôpital Jeanne d'Arc, CHU de Nancy, 54201 Toul, cedex, B.P. 303

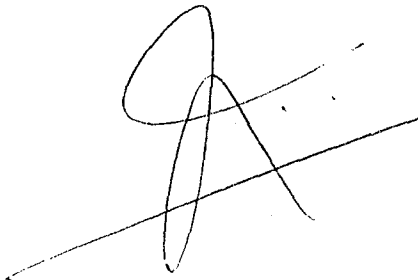
Monsieur et Cher Collègue,

J'ai le plaisir de vous annoncer officiellement que le manuscrit « original article » intitulé : **Title** « *Analysis of the postprandial lipid metabolism : Use of 3-point test.* » **Authors** : B. GUERCI, J.L. PAUL, et al a été définitivement accepté pour publication dans notre revue Diabetes Metabolism et devrait paraître dans le numéro 4 de l'année 2001.

Je vous remercie pour votre contribution et vous prie de recevoir, Monsieur, mes meilleures salutations.

Prof. Serge HALIMI

Rédacteur en Chef



**SUMMARY** - The oral fat load tests used to study postprandial lipemia are complex and costly and time consuming. A simplified fat load test could be more convenient and more appropriate in routine clinical practice because of the number of lipid determinations required. We evaluated the capacity of a postprandial test model that reduced the number of blood samples taken. Thirty three normal weight controls and 17 normotriglyceridemic obese patients (study 1), 10 normolipidemic type 2 diabetic patients and 7 healthy controls (study 2), and 10 hyperlipidemic type 2 diabetic patients studied before and after hypolipidemic therapy (study 3) were analyzed. Blood samples were taken before and up to 8 hours after giving the oral fat load containing retinol. Triglyceride (TG) and retinyl palmitate (RP) concentrations in the plasma, chylomicrons (CM) and non-chylomicron (nCM) fractions were measured. Postprandial lipid responses using conventional area under the curves (AUC<sub>c</sub> using 5 to 7 lipid determinations) were compared to a 3-point test that uses only three sample points to predict the area under the curve (AUC<sub>p</sub>: triglycerides at T<sub>0</sub>, triglycerides at average peak-time (T<sub>4</sub>), and triglycerides at T<sub>8</sub>). The AUC<sub>c</sub> and AUC<sub>p</sub> for triglycerides and retinyl palmitate were highly correlated in each of the groups and whatever the lipid subfraction ( $r=0.664-0.995$ ,  $p < 0.0001$ ). The same trend of differences was found between cases and controls when AUC<sub>p</sub> was used instead of AUC<sub>c</sub>. In conclusion, the simplified 3-point protocol may well be suitable for studies on large groups of subjects.

*Keywords:* postprandial lipemia, oral fat load test, triglyceride-rich lipoproteins, retinyl palmitate, standardization, obesity, type 2 diabetes mellitus.

Postprandial lipid metabolism has received considerable attention since it was shown that postprandial triglyceride-rich lipoproteins (TRL) have been shown to be involved in the development of atherosclerosis [1,2]. Differences in postprandial triglycerides after an oral fat load test have demonstrated by many studies comparing patients with coronary artery disease and controls [3,4]. The postprandial triglyceride concentrations have been shown to be an independent predictor of coronary artery disease in multivariate analysis [5], even after adjustment for fasting triglyceride or HDL-cholesterol in normolipidemic men [6].

Altered postprandial lipemia in obese patients have been reported by several studies [7,8]. These results could explain, at least in part, the greater development of cardiovascular disease in obese people. Alterations in postprandial pathways are also likely to play a role in atherogenesis in type 2 diabetic patients [9,10].

Most studies on postprandial lipemia cover at least an 8-h period, and the area under the curve (AUC) is the index most frequently used to evaluate postprandial lipemia [5,11]. It is also a discriminant marker between controls and patients with altered postprandial TRL removal [1,12]. Despite the large number of published studies on postprandial lipemia, fat load tests are not routinely used in practice, as these tests are complex and not standardized so far. They usually begin in the morning, and are costly and time consuming, limiting the use of postprandial analysis to small populations. However, these tests could be suitable for use in larger studies, and for epidemiological studies on postprandial metabolism if the number of lipid determinations was reduced. We recently reported a pilot study on a small group of normolipidemic men, using a 3-point test with only three triglyceride determinations. We found that the findings correlated well with the total postprandial area under the curve obtained using 8 measurements [13]. This 3-point test has been validated in diurnal and nocturnal trials. But we did not know

whether the 3-point test could be used to study other populations who were eligible for oral fat load tests (OFLT).

Our previous studies on normal-weight subjects and obese patients [14,15] and in type 2 diabetic patients [16,17] showed that the triglyceride peaks after diurnal fat load occurred about T4 hours, as observed in other studies [7,18]. We developed a simplified model to analyze the postprandial lipid responses to an oral fat load test using a reduced number of samples: baseline, 4 and 8 hours. The aim of this analysis was to determine whether the predicted AUC (AUC<sub>p</sub>) obtained from the 3-point test triglyceride determinations lead to the same conclusions as those obtained with the conventional postprandial AUC (AUC<sub>c</sub>).

## ■ PATIENTS AND METHODS

### ***Subjects***

. Study 1: A group of 17 obese patients (5 men, 12 women) and of 33 normal-weight controls (21 men, 12 women) has been recruited. Glucose tolerance and fasting lipid levels were normal in all. Android obese patients were selected according to following criteria: body mass index (BMI) above 30 kg/m<sup>2</sup>, abdominal (android) fat distribution by a waist-to-hip ratio (WHR) over 0.85 in women, and over 0.95 in men [14].

. Study 2: The second study was conducted in 10 well-controlled type 2 diabetic patients treated with oral antidiabetic agents (biguanides and/or sulfonylureas) and in seven healthy controls matched for sex, age and BMI [16].

. Study 3: Ten hypertriglyceridemic men (defined as plasma triglycerides between 2.00 and 5.00 mmol/L) with fairly well-controlled type 2 diabetes mellitus were recruited. All

were treated with oral antidiabetic agents. The patients were studied before and after 5 weeks of bezafibrate (daily dose: 400 mg)[17].

Except for study 3, no patient was taking any medication known to affect lipid metabolism. These projects were approved by the Ethics committees of the Nancy and Reims University Hospitals (France). They conformed to the principles of the declaration of Helsinki, and informed written consent was obtained from all subjects.

### ***Oral fat load test (OFLT)***

The compositions of the fat loads used in the three studies were similar and they were not adjusted for body surface area. The high-fat meals contained 72-85% fat, 2-10% protein and 13-18% carbohydrates, depending on the study [14,16,17]. Each fat load was ingested in 15 min., with 200 mL water. 100,000 IU retinyl ester (Avibon ® 50 000 IU - Theraplix - Rhone Poulenc Rohrer, Paris, France) was added to the fat load to label intestinally-derived lipoparticles.

### ***Biochemical measurements***

We used similar methods in the three studies [14,16,17]. All subjects fasted for 12 hours until 08.00 h, at which time the oral fat load was given. A 21 gauge venous canula was placed in an antecubital vein. Blood samples were collected immediately before the fat load and 2, 3, 4, 5, 6, and 8 hours after (T0, T2, T3, T4, T5, T6, T8) for study 1, and 2, 4, 6 and 8 hours after (T0, T2, T4, T6, T8) for studies 2 and 3. All samples from T0 to T8 were 15 mL blood collected in a vacutainer tube to determine triglycerides and retinyl palmitate in the plasma and in chylomicron and non-chylomicron fractions. All blood samples were immediately centrifuged at 4°C and EDTA plus protease inhibitors were immediately added to the plasma. The chylomicron (CM) fraction (supernatant) containing predominantly chylomicrons (Svedberg flotation, Sf>400) was isolated by ultracentrifugation for 30 min. at 25,000 rpm in a Beckman XL-80 ultracentrifuge, rotor Ti-

SW 41. The infranatant was collected and named the non-chylomicron (nCM) fraction, which contained triglyceride-rich lipoproteins (chylomicron remnants, very-low density lipoproteins (VLDL) and VLDL remnants).

Triglycerides were determined enzymatically (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France; Unipath, Dardilly, France). Retinyl palmitate (RP) was measured by reverse phase high performance liquid chromatography (System Gold, Beckman), according to De Ruyter *et al.* [19]. The detection limit was 0.018 mg/L.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. When the distribution of a variable was not normal, as assessed by skewness and kurtosis tests, data were log-transformed, and statistical analysis was performed on the log-transformed data.

The conventional areas under the time-concentration curves (AUCc) were calculated by the trapezoidal method [20]. We used the same trapezoidal method to predict the conventional postprandial AUCc (AUCp) from three triglyceride determinations (T0, T4 and T8 hours) instead of the complete set of measurements carried out during these tests. The formula for the trapezoid method for AUCp was as follows: (triglyceride T0 x 4) + [(triglyceride T4 - triglyceride T0) x 2] + (triglyceride T8 x 4) + [(triglyceride T4 - triglyceride T8) x 2]. Incremental AUC (iAUC) was evaluated after subtracting the initial individual values (T0) for triglycerides from all respective postprandial measurements, yielding the net postprandial change.

Means of AUCc and AUCp were compared between groups by the Mann-Whitney U-test (study 1) or by Student's unpaired and paired *t*-tests (studies 2 and 3). Linear regression was used to calculate the correlation coefficients and equations for the regression slopes. AUCc and AUCp data were subjected to difference analysis. This statistical method is appropriate for comparing biological measurements or methods [21].

The AUCs are expressed in mmol/L.h for triglyceride values and in mg/L.h for retinyl palmitate values. Significance was implied at  $p < 0.05$ . StatView® software (Abacus Concepts Inc., StatView V; Brain Power, Calabasas, Ca) was used for all calculations.

## ■ RESULTS

### ***Time of the postprandial triglyceride peak***

The peak times of triglycerides in plasma, chylomicron and non-chylomicron fractions were shown for each separated group in *Table I*. The peaks of triglycerides appeared between the 4th and the 5th hour of the postprandial period according to the studied groups. When the results were pooled (controls, obese and type 2 diabetic patients), the time of postprandial triglyceride peak was close to the fourth hour (from 4.34 to 4.49 hours, according to the lipid fractions (plasma, chylomicron or non-chylomicron)) for the pooled group of 87 subjects.

### ***Comparison of conventional AUC and predicted AUC***

AUCp and AUCc gave the same trends of results when they were used to compare subjects and patients.

Study 1 (*Table II*). The AUCc of non-chylomicron triglycerides was significantly greater in obese patients than in controls ( $p < 0.01$ ), whereas the AUCcs for retinyl palmitate in the plasma and non-chylomicron fraction were significantly higher in controls than in the obese subjects ( $p < 0.05$ ). The differences obtained for triglycerides and retinyl palmitate in the plasma and lipid subfractions with the AUCcs were also obtained with the AUCp. In particular, the AUCp for triglycerides in the non-chylomicron fraction remained significantly different between obese patients and controls, at the same level of significance as that obtained by AUCc. The AUCp for plasma triglycerides in controls and



obese patients were also significantly different, whereas the AUCc showed no significant difference ( $p = 0.23$ ). The differences between the retinyl palmitate levels of obese and control subjects were in the same order of magnitude for AUCc and AUCp, except for the AUCp plasma retinyl palmitate ( $p = 0.061$ ).

Study 2 (*Table III*). The AUCc values for plasma triglycerides for the normolipidemic type 2 diabetic patients and controls were not different. The AUCc values for retinyl palmitate in the plasma and in the non-chylomicron fraction were significantly higher in type 2 diabetic patients than in controls ( $p < 0.05$ ). The same trend was observed for differences between the retinyl palmitate levels in controls and in type 2 diabetic patients with AUCp and AUCc, but difference using the AUCp did not reach statistical significance ( $p = 0.10$  for retinyl palmitate in plasma;  $p = 0.071$  for retinyl palmitate in non-chylomicrons).

Study 3 (*Table IV*). The plasma triglyceride response was significantly reduced by bezafibrate treatment, mostly owing to changes in the chylomicron fraction ( $p < 0.01$ ). The postprandial triglyceride response in the non-chylomicron fraction was also significantly reduced ( $p < 0.01$ ). The AUCc for retinyl palmitate in the chylomicron fraction was reduced by treatment, but the difference was not significant. Both AUCc and AUCp showed significant differences in triglycerides in plasma and lipid subfractions between the two groups. There was also a significant difference between the two groups for retinyl palmitate in chylomicrons, whereas the difference was not significant with AUCc ( $p = 0.084$ ).

### ***Assessment of the agreement between conventional and predicted AUCs***

The AUCp was well correlated with the AUCc in each of the groups studied, and also when the data were pooled (*Table V*). All the coefficients of correlation between AUCc and AUCp were highly significant for triglycerides and retinyl palmitate and whatever the

lipid subfraction ( $p < 0.0001$ ). When iAUC were used, the coefficients of correlation for triglycerides remained highly significant between iAUCc and iAUCp ( $r = 0.718-0.979$ ,  $p < 0.01-0.0001$ ).

We also checked by difference analysis the agreement between the two methods of AUC calculation (AUCc and AUCp) for pooled data to assess the accuracy of the AUCp model. 95% of the differences should lie within the mean  $\pm 2$  standard deviation if they are normally distributed.

The means of differences between AUCc and AUCp for triglyceride values (*Figure 1*) were small (0.34 - 0.74 mmol/L.h), and the confidence intervals were acceptable considering the range of the AUCs values (5.60 to 79.8 mmol/L.h for plasma triglycerides). For AUC for triglycerides in the chylomicron fraction, 6 values were outside the mean  $\pm 2$ SD limit, whereas 5 plasma triglyceride values and 3 non-chylomicron triglyceride values were outside this limit, for a total of 14/261 cases. When the aberrant values were analyzed separately, we found that 10 of the 14 triglyceride values outside the mean  $\pm 2$ SD limit were associated with triglyceride levels at T0 above 2.00 mmol/L (2.21 - 4.63 mmol/L).

The means of differences for retinyl palmitate (*Figure 2*) were also low (-0.05 to 0.17 mg/L.h). Thirteen values were outside the mean  $\pm 2$ SD limit. The aberrant values in AUC for retinyl palmitate occurred for the highest average of AUC retinyl palmitate in plasma or in lipid subfractions.

## ■ DISCUSSION

We find that data obtained with a simplified model of AUC using only 3 points to analyse postprandial lipemia are well correlated with those obtained by conventional AUC.

Thus AUC<sub>p</sub> may be a good evaluation of the AUC<sub>c</sub>. We also demonstrated that the AUC<sub>p</sub> allows to the same conclusions as AUC<sub>c</sub> when healthy subjects were compared to patients with altered postprandial metabolism. These results were obtained in normolipidemic healthy populations, obese and type 2 diabetic patients, in cross-sectional and longitudinal studies.

We used the 3 points assay to assess the lipid parameters in the plasma and different subfractions in three studies because the times of the triglyceride peaks in plasma, chylomicron and non-chylomicron fractions were similar, at around 4 hours (data not shown). This is in agreement with several studies using amounts of fat below 100g [7,22,23], reporting that the mean plasma triglyceride peak time occurred at about T4 hours. The synchronuous nature of the triglyceride peak times in the plasma, chylomicron and non-chylomicron fractions in the three studies has also been reported [24].

The significant differences initially observed between cases and controls with AUC<sub>c</sub> were also found when the AUC<sub>p</sub> was used, leading to the same conclusions about postprandial metabolism. However, the differences in AUC<sub>p</sub> for retinyl palmitate were not statistically significant between type 2 diabetic patients and controls in study 2, suggesting that AUC<sub>p</sub> should be not used to study small populations ( $n < 10$ ).

The AUC<sub>p</sub> results were highly correlated with the AUC<sub>c</sub> data. However, the use of correlation is misleading; we therefore used the method developed by Bland & Altman [21] to assess the agreement between AUC<sub>c</sub> and AUC<sub>p</sub>. Aberrant values for triglycerides were observed in 14 out of 261 cases. Ten of these 14 values were observed in patients who had plasma triglyceride concentrations at T0 above 2.00 mmol/L. Several authors consider that an oral fat load test is not required for patients with high fasting plasma triglycerides, and that this test may be used only for populations without evidently abnormal fasting lipid metabolism [12,25].

The AUCp test appears to be less valid for retinyl palmitate values. This could be due to variations in the plasma peak of retinyl palmitate after an oral fat load test, as observed in our studies and in agreement with the others [26-28]. In addition, the inter- and intraindividual coefficients of variation are higher for retinyl palmitate than those obtained for triglycerides [12,25].

The AUCp test is useful because the AUCp may be calculated from three lipid determinations, regardless of the individual peak values. It can therefore be used in routine clinical practice and the cost of an oral fat load test reduced by almost 50%. Larger studies analysing the postprandial state may be feasible with AUCp as the number of blood samples and lipid determinations may be reduced. Moreover, whether only 3 points are used reducing the quantities of blood samples, other parameters which are not routinely evaluated during the postprandial state should be investigated. This simplified test may be used for populations who are eligible for an oral fat load test, as we have recently demonstrated on a small population of normolipidemic men in diurnal, but also in nocturnal trial [13].

In conclusion, the simplified 3-point test appears to be convenient for use in populations suspected to have altered postprandial metabolism. It simplifies the analyses of postprandial lipid metabolism by reducing to 3 the number of blood samples and lipid determinations required.

*Aknowledgments* - We thank the staff of the Centre d'Investigation Clinique du CHU de Nancy for clinical help and the staff of Broussais Hospital for technical assistance. Owen Parkes checked the English text.

## REFERENCES

1. Miesenbock G, Patsch JR. Postprandial hyperlipidemia: the search for the atherogenic lipoprotein. *Curr Opin Lipid*, 1992, 3, 196-201.
2. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*, 1979, 60, 473-485.
3. Nikkila M, Solakivi T, Lehtimäki T, Koivula T, Laippala P, Astrom B. Postprandial plasma lipoprotein changes in relation to apolipoprotein E phenotypes and low density lipoprotein size in men with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1994, 106, 149-157.
4. Groot PHE, Van Stiphout WAHJ, Krauss XH, *et col*. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11, 653-662.
5. Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, *et al*. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12, 1336-1345.
6. Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, *et al*. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *BMJ*, 1996, 312, 935-939.
7. Lewis GF, O'meara NM, Soltys PA, *et al*. Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71, 1041-1050.
8. Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, *et al*. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes*, 1998, 47, 953-960.

9. Ida Chen YD, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM. Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM ? *Diabetes Care*, 1995, 18, 10-16.
10. Reznik Y, Pousse P, Herrou M, Morello J, Drosdowsky MA, Fradin S. Postprandial lipoprotein metabolism in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients: Influence of apolipoprotein E polymorphism. *Metabolism*, 1996, 45, 63-71.
11. Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, *et al.* Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1990, 85, 193-202.
12. Karpe F, Hamsten A. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipid*, 1995, 6, 123-129.
13. Hadjadj S, Paul JL, Meyer L, *et al.* Delayed changes in postprandial lipid in young normolipidemic men after a nocturnal vitamin A oral fat load test. *J Nutr*, 1999, 129, 1649-1655.
14. Guerci B, Vergès B, Durlach V, Hadjadj S, Drouin P, Paul JL. Relationship between altered postprandial lipemia and insulin resistance in normolipidemic and normoglycose tolerant obese patients. *Int J Obes*, 2000, 24, 468-478.
15. Guerci B, Hadjadj S, Quilliot D, Ziegler O, Drouin P. No acute response of leptin to an oral fat load in obese patients and during circadian rhythm in healthy controls. *Eur J Endocrinol*, 2000, 143, 649-655.
16. Durlach V, Attia N, Zahouani A, Leutenegger M, Girard-Globa A. Postprandial cholesteryl ester transfer and high density lipoprotein composition in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients. *Atherosclerosis*, 1996, 120, 155-165.
17. Attia N, Durlach V, Roche D, *et al.* Post-prandial metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin-dependent diabetic patients before and after bezafibrate treatment. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27, 55-63.

18. Karpe F, Bell M, Björkegren J, Hamsten A. Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 199-207.
19. De Ruyter MGM, De Leenheer AP. Simultaneous determination of retinol and retinyl esters in serum or plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Clin Chem*, 1978, 24, 1920-1924.
20. Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royton P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ*, 1990, 300, 230-235.
21. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986, 1, 307-310.
22. Mekki N, Christofilis MA, Charbonnier M, *et al.* Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84, 184-191.
23. Vansant G, Mertens A, Muls E. Determinants of postprandial lipemia in obese women. *Int J Obes*, 1999, 23, 14-21.
24. Schrezenmeir J, Weber P, Probst R, *et al.* Postprandial pattern of triglyceride-rich lipoprotein in normal-weight humans after an oral lipid load: exaggerated triglycerides and altered insulin response in some subjects. *Ann Nutr Metab*, 1992, 34, 186-196.
25. Krasinski SD, Cohn JS, Russell RM, Schaefer EJ. Postprandial plasma vitamin A metabolism in humans: a reassessment of the use of plasma retinyl esters as markers for intestinally derived chylomicrons and their remnants. *Metabolism*, 1990, 39, 357-365.
26. Cortner JA, Coates PM, Le NA, *et al.* Kinetics of chylomicron remnant clearance in normal and in hyperlipoproteinemic subjects. *J Lipid Res*, 1987, 28, 195-206.

27. Uiterwaal CSPM, Grobbee DE, Witteman JCM, *et al.* Postprandial triglyceride response in young adult men and familial risk for coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med*, 1994, 121, 576-583.
28. Heller FR, Vandenplas C, Desager JP, Harvengt C. The vitamin A fat-loading test in young normolipidemic subjects. *Clin Chim Acta*, 1993, 219, 167-176.



Table I . Plasma and lipid subfractions triglyceride peak times, according to the studied groups.

	Study 1		Study 2		Study 3	
	Controls (n = 33)	Obeses (n = 17)	Controls (n = 7)	Type 2 DM (n = 10)	Before (n = 10)	After (n = 10)
Plasma triglyceride peak time (h)	4.45 ± 1.35	4.29 ± 1.65	3.71± 0.76	4.40± 1.84	5.00± 1.05	5.00± 1.05
CM triglyceride peak time (h)	4.36 ± 1.27	4.82 ± 1.81	3.43 ± 0.97	3.89 ± 1.62	4.40 ± 1.58	4.20 ± 1.48
nCM triglyceride peak time (h)	4.15 ± 1.46	4.29 ± 1.36	3.71 ± 0.76	4.22 ± 1.86	5.00 ± 1.94	5.00 ± 1.94

Data are means ± standard deviations (SD). Means were compared by Mann-Whitney U test (study 1) and by Student's unpaired or paired *t*-tests (studies 2 and 3) to assess the differences between groups. CM: chylomicron fraction; nCM: non-chylomicron fraction. DM: diabetes mellitus.

Table II. Comparisons between obese and controls for TG and RP in plasma and in lipid subfractions using AUCc and AUCp.

Study 1	AUCc		AUCp	
	Controls	Obeses	Controls	Obeses
Plasma triglyceride (mmol/L.h)	10.99 ± 3.83	11.75 ± 2.93	10.06 ± 3.77	11.36 ± 2.67 §
CM triglyceride (mmol/L.h)	2.87 ± 1.28	2.34 ± 0.97	2.47 ± 1.39	2.07 ± 0.85
nCM triglyceride (mmol/L.h)	7.16 ± 2.35	8.53 ± 2.25 *	6.78 ± 2.29	8.40 ± 2.13 §
Plasma retinyl palmitate (mg/L.h)	5.02 ± 2.56	3.63 ± 1.54 *	4.69 ± 2.44	3.42 ± 1.42 ‡
CM retinyl palmitate (mg/L.h)	2.44 ± 1.38	1.89 ± 0.97	2.42 ± 1.32	1.95 ± 1.23
nCM retinyl palmitate (mg/L.h)	2.59 ± 1.46	1.72 ± 0.82 *	2.30 ± 1.55	1.47 ± 0.76 §

Data are means ± standard deviations (SD). Means were compared by Mann-Whitney U test to assess the differences between controls and obese by AUCc and AUCp. AUC: area under the curve; AUCc: conventional AUC; AUCp: predicted AUC; CM: chylomicron fraction; nCM: non-chylomicron fraction. \* p < 0.05-0.01 between obese and controls for AUCc; ‡ p < 0.10, § p < 0.05 between obese and controls for AUCp.

Table III. Comparisons between between type 2 diabetics and controls for TG and RP in plasma and in lipid subfractions using AUCc and AUCp.

Study 2	AUCc		AUCp	
	Controls	Type 2 DM	Controls	Type 2 DM
Plasma triglyceride (mmol/L.h)	14.14 ± 3.71	14.72 ± 4.81	15.69 ± 6.64	13.90 ± 4.99
CM triglyceride (mmol/L.h)	4.48 ± 2.84	3.73 ± 1.96	4.74 ± 3.17	3.21 ± 1.80
nCM triglyceride (mmol/L.h)	10.66 ± 3.16	10.68 ± 3.48	10.96 ± 3.54	10.55 ± 3.77
Plasma retinyl palmitate (mg/L.h)	2.97 ± 1.50	6.68 ± 4.11 *	3.61 ± 2.65	6.63 ± 4.08 ‡
CM retinyl palmitate (mg/L.h)	2.29 ± 1.23	4.96 ± 3.32	2.34 ± 2.24	4.00 ± 3.47
nCM retinyl palmitate (mg/L.h)	1.07 ± 0.51	2.81 ± 1.60 *	1.27 ± 0.79	2.63 ± 1.71 ‡

Data are means ± standard deviations (SD). Means were compared by Student's unpaired *t*-test to assess the differences between type 2 diabetics and controls by AUCc and AUCp. AUC: area under the curve; AUCc: conventional AUC; AUCp: predicted AUC; CM: chylomicron fraction; nCM: non-chylomicron fraction. \* *p* < 0.05 between type 2 diabetics and controls for AUCc; ‡ *p* < 0.10 between type 2 diabetics and controls for AUCp. DM: diabetes mellitus.

Table IV. Comparisons between before and after bezafibrate treatment for TG and RP in plasma and in lipid subfractions using AUCc and AUCp.

Study 3	AUCc		AUCp	
	Before BZ	After BZ	Before BZ	After BZ
Plasma triglyceride (mmol/L.h)	63.97 ± 32.01	33.92 ± 17.43 *	62.21 ± 32.53	32.54 ± 17.68 §
CM triglyceride (mmol/L.h)	33.48 ± 21.71	15.42 ± 8.48 *	31.63 ± 22.07	15.39 ± 9.40 §
nCM triglyceride (mmol/L.h)	30.49 ± 11.42	18.50 ± 10.58 *	30.57 ± 11.96	17.15 ± 9.68 §
Plasma retinyl palmitate (mg/L.h)	3.77 ± 2.96	2.11 ± 1.12	3.91 ± 2.53	2.08 ± 1.26 ‡
CM retinyl palmitate (mg/L.h)	3.17 ± 2.77	1.48 ± 0.95 #	3.29 ± 2.29	1.47 ± 1.02 §
nCM retinyl palmitate (mg/L.h)	0.61 ± 0.39	0.62 ± 0.30	0.66 ± 0.46	0.62 ± 0.39

Data are means ± standard deviations (SD). Means were compared by Student's paired *t*-test to assess the differences between before and after bezafibrate treatment AUCc and AUCp. AUC: area under the curve; AUCc: conventional AUC; AUCp: predicted AUC; CM: chylomicron fraction; nCM: non-chylomicron fraction. # *p* < 0.10, \* *p* < 0.01 between before and after bezafibrate treatment for AUCc; ‡ *p* < 0.10, § *p* < 0.05 between before and after bezafibrate treatment for AUCp. BZ: bezafibrate.

Table V. Correlation coefficients between predicted AUC and conventional AUC, according to the lipid subfractions and to the studied groups

	All	Study 1		Study 2		Study 3	
	All	Controls	Obeses	Controls	Type 2 DM	Before BZ	After BZ
	(n = 87)	(n = 33)	(n = 17)	(n = 7)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)
Plasma triglyceride	0.995	0.917	0.918	0.991	0.953	0.986	0.994
CM triglyceride	0.991	0.777	0.772	0.979	0.944	0.980	0.985
nCM triglyceride	0.992	0.973	0.978	0.994	0.969	0.985	0.989
Plasma retinyl palmitate	0.947	0.938	0.909	0.917	0.957	0.950	0.986
CM retinyl palmitate	0.868	0.833	0.807	0.962	0.965	0.944	0.986
nCM retinyl palmitate	0.893	0.905	0.664	0.947	0.772	0.986	0.945

A regression test was used to test univariate correlations between continuous variables. Linear regression was used to calculate the correlation coefficients and equations for the regression slopes. All correlation coefficients were at the level of significance of  $p < 0.0001$ . AUC: area under the curve; CM: chylomicron fraction; nCM: non-chylomicron fraction; DM: diabetes mellitus. BZ: bezafibrate.

FIG. 1. Difference analysis for area under the curve for triglycerides in plasma and lipid subfractions, obtained by the conventional trapezoidal method and by the simplified 3-point method

FIG. 2. Difference analysis for areas under the curves for retinyl palmitate in the plasma and lipid subfractions, obtained by the conventional trapezoidal method and by the simplified 3-point method

Fig. 1

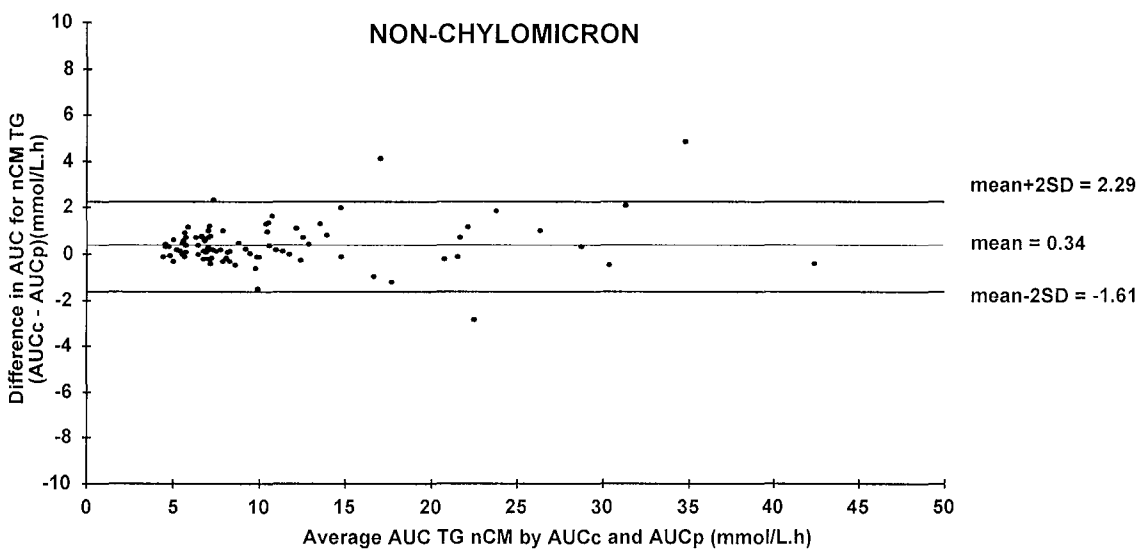
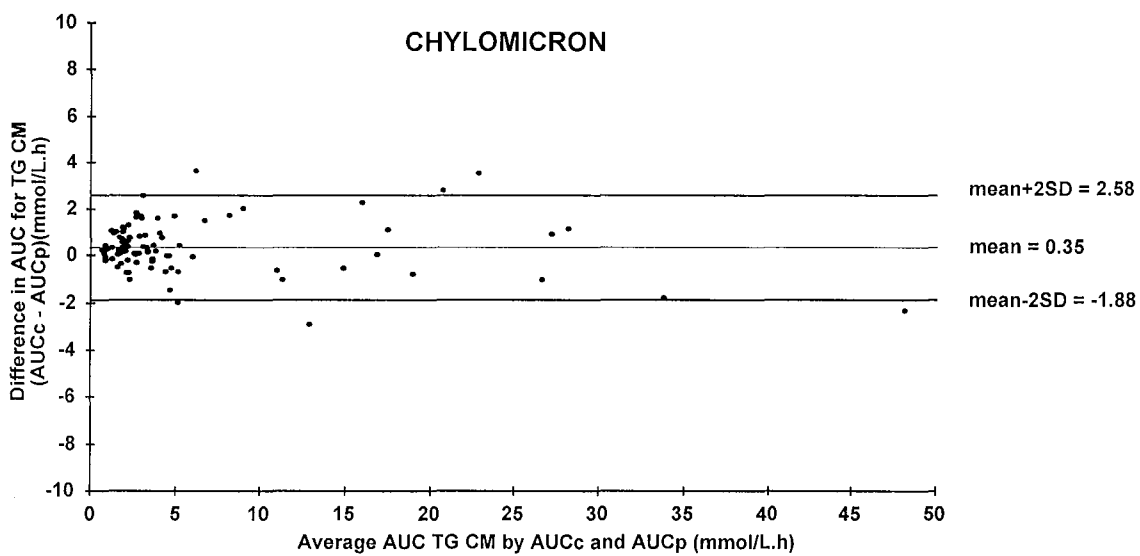
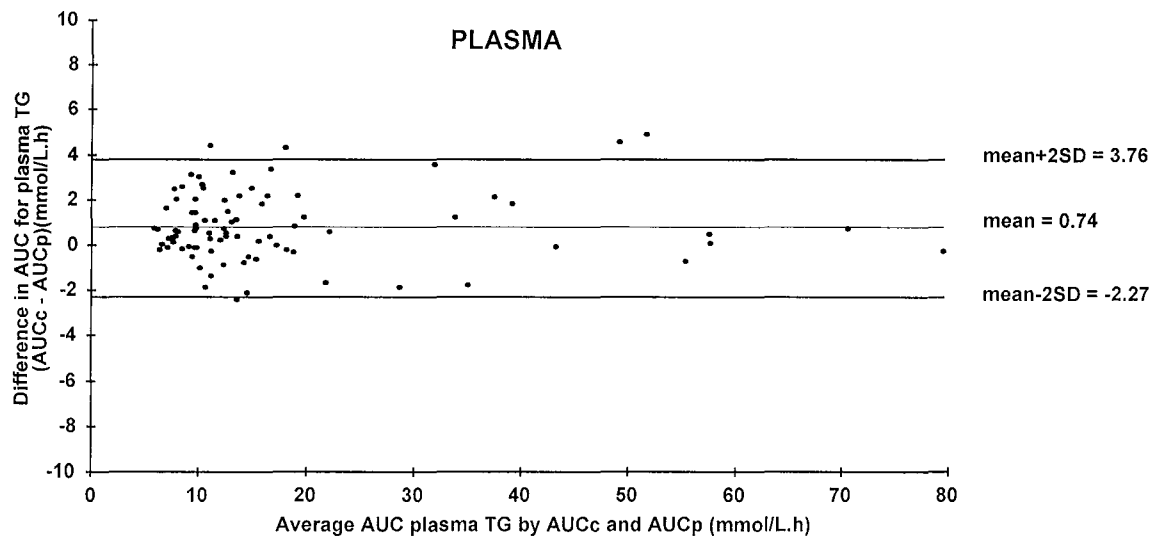
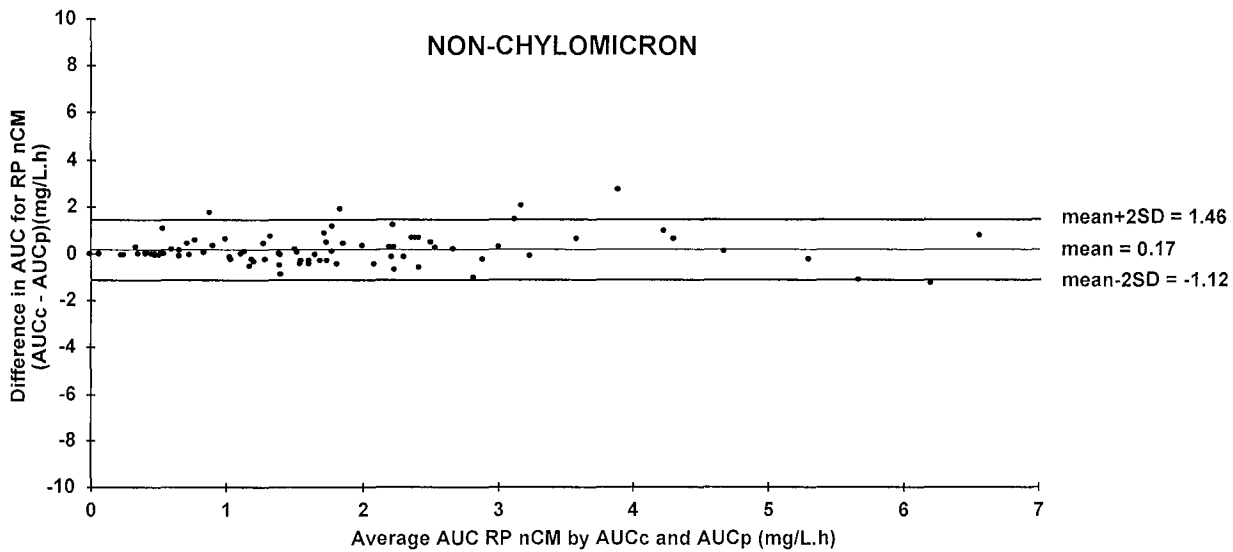
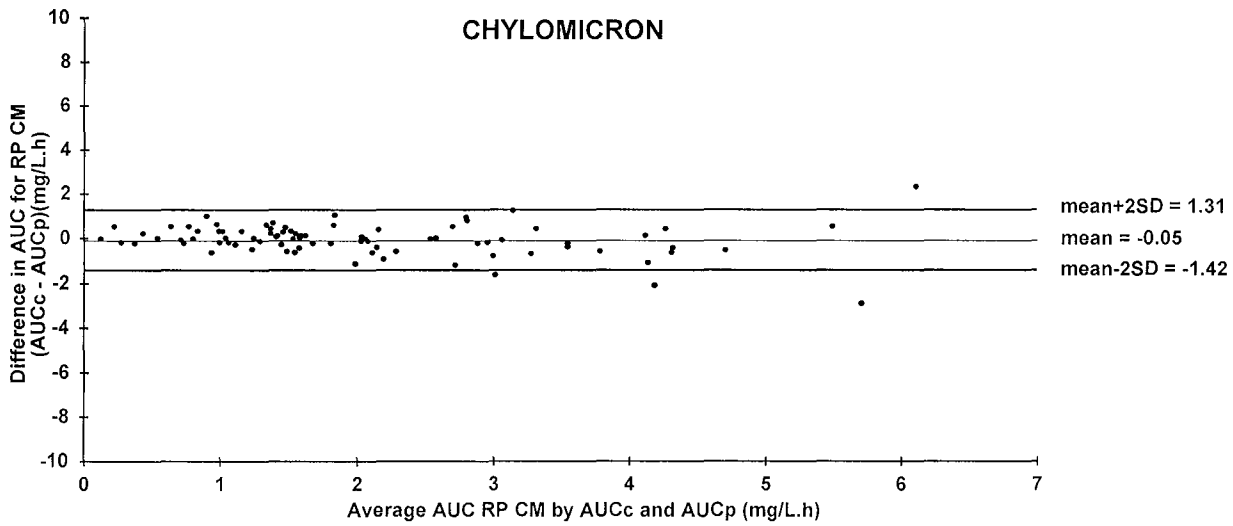
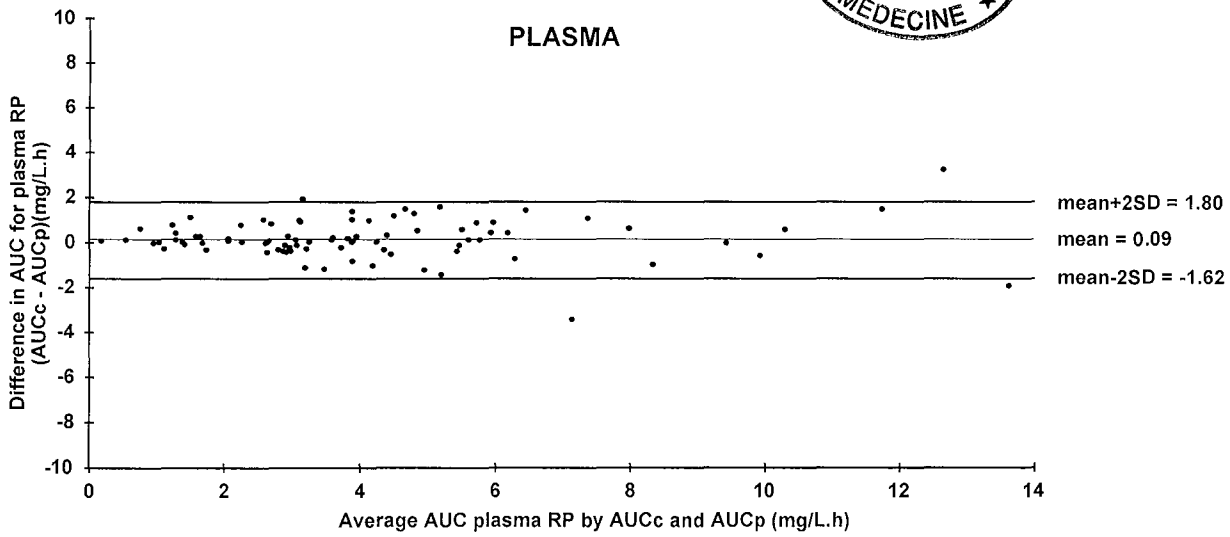




Fig. 2





Nom : Monsieur GUERCI  
Prénom : Bruno

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

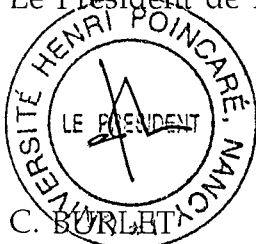
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 3 juillet 2001 n° 529

Le Président de l'Université



**RESUME : Influence de la sensibilité à l'insuline et de l'obésité sur le métabolisme postprandial des lipoprotéines riches en triglycérides**

Les apports alimentaires d'un homme normal, absorbant au minimum trois repas quotidiens composés en partie de lipides, entraînent des modifications répétées de l'équilibre lipidique dont l'état à jeun n'est qu'un reflet partiel et limité. L'évolution des connaissances biochimiques et moléculaires des lipides a par ailleurs permis de démontrer l'athérogénicité des lipoprotéines riches en triglycérides, en particulier en période postprandiale. Au cours de l'obésité à distribution viscérale, du diabète de type 2, mais également chez des patients atteints d'hypertension artérielle ou de maladie cardiovasculaire, des altérations du métabolisme lipidique postprandial ont été clairement démontrées. Dans ces situations pathologiques, où la sensibilité à l'action de l'insuline est diminuée, la responsabilité des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine hépatique dans ces altérations est fortement suspectée. Cette diminution de la sensibilité à l'insuline entraîne en effet des bouleversements du métabolisme lipidique au niveau enzymatique, hépatique et adipocytaire, qui se traduisent par une compétition métabolique entre les lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale et hépatique en période postprandiale. L'analyse du métabolisme lipidique postprandial se heurte cependant à des difficultés d'ordre méthodologique, qui amènent à proposer une évolution dans la réalisation de ces tests dynamiques. La réflexion doit tendre vers un processus de standardisation des épreuves lipidiques et donc vers une simplification de leur réalisation pratique.

**Mots-clés :** lipémie postprandiale, insulino-résistance, repas lipidique test, lipoprotéines riches en triglycérides, palmitate de rétinol, standardisation, obésité, diabète de type 2, athérosclérose

---

**SUMMARY: Influence of insulin sensitivity and obesity on postprandial metabolism of triglyceride-rich lipoproteins**

The dietary intake of a normal human being having at least three fat-containing meals per day, leads to repeated changes in the lipid balance which are only partially reflected in the fasting state. Advances in our knowledge of the biochemistry and molecular biology of lipids have shown that the triglyceride-rich lipoproteins are atherogenic, especially during the postprandial period. Postprandial lipid metabolism has been clearly demonstrated to be altered in obesity, type 2 diabetes, and also in patients with hypertension or cardiovascular disease. Triglyceride-rich lipoproteins derived from liver are believed to be responsible for these lipid alterations, when the insulin sensitivity is reduced. This decrease of insulin sensitivity leads to alterations of lipid metabolism involving enzymes, liver and adipocytes, resulting in metabolic competition between the triglyceride-rich lipoproteins from the gut and those from the liver during the postprandial state. But the analysis of postprandial metabolism is hindered by methodological difficulties, and there is now a need to standardize lipid analyses and hence simplify their performance.

**Key-words :** postprandial lipemia, insulin resistance, oral fat load, triglyceride-rich lipoproteins, retinyl palmitate, standardization, obesity, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis

---

**Discipline :** Biologie, Santé et Environnement – Génie Biologique et Médical

**Intitulé et adresse du laboratoire :** Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Maladies de la Nutrition & Centre d'Investigation Clinique / INSERM du CHU de Nancy