

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

U.F.R. DE PHARMACIE

**ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU
CHOLESTEROL CHEZ L'HOMME
A L'AIDE DES MARQUEURS DIRECTS ET INDIRECTS :
INFLUENCE DES FACTEURS
NUTRITIONNELS ET GENETIQUES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Pathologie humaine

Spécialité : Nutrition

présentée et soutenue publiquement par

Estelle WOLFF

le 3 décembre 2010

JURY

Rapporteurs	Monsieur Michel Beylot, Directeur de Recherche Monsieur Michel Krempf, Professeur
Examineurs	Monsieur Eric Marchioni, Professeur Monsieur Alain Nicolay, Docteur Monsieur Denis Lairon, Directeur de Recherche
Directeur de thèse	Monsieur Henri Portugal, Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur Michel Beylot

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteur et de juger ce travail de thèse. Merci aussi d'avoir bien voulu vous déplacer jusqu'à Marseille pour siéger dans ce Jury de Thèse.

A Monsieur le Professeur Michel Krempf

Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail en étant rapporteur et membre de ce Jury de Thèse. Merci également d'avoir fait le déplacement jusqu'à Marseille.

A Monsieur le Professeur Eric Marchioni

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mes remerciements quant au jugement de ce mémoire. Merci d'avoir accepté de quitter Strasbourg à une heure si matinale pour vous joindre à ce Jury de Thèse.

A Monsieur le Docteur Denis Lairon

Je tiens à adresser toute ma gratitude pour son inestimable implication dans ce travail de recherche. Merci d'avoir toujours été présent dans mon parcours de doctorante.

A Monsieur le Professeur Henri Portugal

Je tiens à adresser mes vifs remerciements pour m'avoir accueillie dans son service, pour son soutien et ses conseils, qui ont largement contribué à la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Docteur Alain Nicolay.

Je tiens à adresser ma profonde reconnaissance pour m'avoir guidée et conseillée tout au long de ma recherche.

A Madame Marie-France Vergnes.

J'adresse un grand merci pour son soutien, ses conseils et son accompagnement quotidien qui ont largement contribué à la réalisation de ce travail. Je n'oublierai pas toutes ces années à ses côtés.

Un grand merci à toute l'équipe de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Marseille pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire.

A mes amis, sans lesquels le travail paraît toujours plus difficile

A Carmen et Tibi, Sacha et Anne-Gaëlle, Fred et Marie, Khanh-Ngan et Nicolas, David et Christelle, à leurs adorables enfants et à Mihai, mes amis de « là-haut », que la distance n'éloigne aucun sentiment,

A Gaëlle et Vincent, Charlotte et Julien, Fanny et Christophe, Marie et Nicolas, Laetitia et Sylvain et toute la tribu de chérubins, Samuel et Cécile, Thalie, Bema, Anne et Alexandre, mes amis « de Marseille », ceux qui contribuent au petit bonheur quotidien,

A « mes Tatas », Souad, Nathalie et leurs maris, sans qui mes enfants ne se seraient pas épanouis de la même manière

A ma famille,

Mes parents et mes beaux-parents qui traversent la France pour s'occuper de mes deux trésors, qui m'ont toujours soutenue tout au long de mes études et sans lesquels je ne serai pas arrivée jusqu'ici...

A mes sœurs Céline, « le meilleur cuisinier du monde », Sandrine, mon plus beau modèle de carrière universitaire, Séverine, avec laquelle je partage cette indescriptible complicité, celle qui m'a permis de gravir mon Everest...

A Fred, que j'ai toujours admiré et qui m'a donné goût à la Pharmacie, Ethan, Eléa, Martin, qui contribuent à mon bonheur

A Flo, Jordane et Julien avec qui je partage ces moments que l'on n'oublie pas

A Greg avec qui je construis le Bonheur, malgré toutes les petites choses de la vie et cet insupportable stress qui monte en *crescendo* jusqu'à la soutenance (promis, il n'y aura pas de troisième thèse !)

A Titouan et Marjane, comme deux joyaux à mes yeux, qui m'émerveillent chaque jour un peu plus...

PUBLICATIONS

Estelle Wolff, Marie-France Vergnes, Henri Portugal, Catherine Defoort, Denis Lairon, Alain Nicolay. The effects of Mediterranean-type diet on surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis, and cholesterol levels in subjects with moderate cardiovascular risk factors. Soumis à *J Nutr*.

Estelle Wolff, Marie-France Vergnes, Catherine Defoort, Richard Planells, Henri Portugal, Alain Nicolay, Denis Lairon. Cholesterol absorption status and fasting plasma cholesterol are modulated by the Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein -493 G/T polymorphism and the usual diet in women. *Genes Nutr*. 2010;1-9. doi:10.1007/s12263-010-0174-x. Sous presse.

Estelle Wolff, Marie-France Vergnes, Jacques Kaloustian, Lydia Abou, Céline Mikail, Denis Lairon, Henri Portugal, Alain Nicolay. A new approach to overcome natural cholesterol interference during simultaneous determination of two stable isotope-enriched cholesterol tracers in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007 ; 21(19) : 3175-9.

POSTER

Estelle Wolff, Marie-France Vergnes, Catherine Defoort, Richard Planells, Henri Portugal, Alain Nicolay, Denis Lairon. Effects of dietary intervention on cholesterol absorption in women with moderate cardio-vascular risk factors according to the Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein - 493 G/T polymorphism. Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose. Biarritz (France)- Juin 2010.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	12
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE I. METABOLISME DES STEROLS ET DES LIPOPROTEINES INTESTINALES.....	16
1. Principaux stérols alimentaires	16
1.1. Cholesterol endogène et exogène	16
1.2. Les phytostérols.....	18
1.3. Digestion et absorption des stérols alimentaires	19
1.3.1 Digestion du cholestérol et des phytostérols.....	19
1.3.2 Absorption intestinale du cholestérol et des stérols	21
a) Captation entérocytaire	21
b) Transporteurs impliqués dans l'absorption intestinale des stérols.....	22
♦ NPC1L1	23
♦ Les transporteurs ATP-binding cassettes ou « ABC transporteurs ».....	25
• ABC A1	25
• ABCG5/G8	26
♦ Les récepteurs « éboueurs » de classe B ou « Scavenger Receptor class B ».....	27
• SR-B1	27
• CD36 ou FAT/CD-36	29
1.3.3 Implication de facteurs de transcription dans l'absorption intestinale des stérols	30
♦ LXRs.....	30
♦ PPARs.....	31
♦ SREBPs.....	31
2. Métabolisme postprandial des lipoprotéines	32
2.1. Les lipoprotéines	32
2.2. Métabolisme des lipoprotéines en période postprandiale.....	34
2.2.1 Vue d'ensemble du métabolisme des lipoprotéines.....	34
2.2.2 Assemblage des lipoprotéines intestinales.....	37
a) Les chylomicrons	38
♦ Mécanisme d'assemblage des chylomicrons	38
♦ Rôle de la MTP dans l'assemblage des chylomicrons	41
♦ Rôle de l'ACAT2 dans l'assemblage des chylomicrons.....	42
b) Régulation de la sécrétion des chylomicrons	42
c) Les HDL intestinales.....	44

1. Facteurs intervenant dans la variabilité d'absorption du cholestérol.....	46
1.1. Le statut physiologique	47
1.1.1 L'âge	47
1.1.2 Le statut hormonal : différences entre hommes et femmes.....	48
1.1.3 L'obésité	49
1.1.4 Implication de facteurs intestinaux dans la régulation de l'absorption du cholestérol	50
a) Le transit intestinal.....	50
b) Rôle des sels biliaires.....	50
c) Rôle des enzymes pancréatiques.....	51
1.2. Les facteurs nutritionnels	52
1.2.1 Influence des lipides alimentaires sur l'absorption du cholestérol	53
1.2.2 Régime occidental.....	53
1.2.3 Régime méditerranéen	54
1.2.4 Régime supplémenté en phytostérols et phytostanols.....	56
1.3. Les facteurs génétiques	57
1.3.1 Les différences ethniques.....	57
1.3.2 Les maladies génétiques	57
1.3.3 Polymorphismes de gènes impliqués dans le processus d'absorption du cholestérol..	59
a) NPC1L1	60
b) Les apolipoprotéines : l'exemple de l'apoE.....	61
c) MTP	62
d) ATP-binding cassette transporters G5 et G8.....	63
e) SR-B1.....	64
1.4. Statut d'absorption du cholestérol et réponse à un régime.....	65
1.4.1 Notion de faible et fort absorbeur de cholestérol.....	65
1.4.2 Notion de répondeur et non répondeur à un régime.....	66
2. Implication des stérols alimentaires dans le développement des maladies cardio-vasculaires	67
2.1. Cholestérol des lipoprotéines	67
2.2. Oxystérols	68
2.3. Phytostérols	69
3. Modulateurs pharmacologiques de l'absorption du cholestérol	70
3.1. Les traitements actuels	71
3.1.1 Les statines.....	71
3.1.2 Les fibrates.....	71
3.1.3 Les séquestrants biliaires	71

3.1.4	L'Ezetimibe	72
3.1.5	Les phytostérols et phytostanols	73
3.2.	Les traitements d'avenir	74
3.2.1	Les inhibiteurs de la MTP	74
3.2.2	Les inhibiteurs de l'ACAT.....	74
3.2.3	Les inhibiteurs d'IBAT	75
4.	<i>Moyens d'étude de la variabilité d'absorption du cholestérol</i>	75
4.1.	Méthode indirecte : marqueurs d'absorption et de synthèse	76
4.1.1	Marqueurs d'absorption.....	78
a)	Les phytostérols	78
b)	Le cholestanol	78
4.1.2	Marqueurs de synthèse.....	79
a)	Le lathostérol	79
b)	Le desmostérol.....	79
4.1.3	Intérêts de la méthode indirecte	80
4.1.4	Limites de la méthode indirecte.....	80
4.2.	Méthode directe : les isotopes stables	81
4.2.1	Les isotopes stables et radioactifs	81
4.2.2	Intérêts de la méthode directe	84
4.2.3	Limites de la méthode directe	84
	TRAVAUX PERSONNELS	86
	ARTICLES	89
	INTRODUCTION A L'ARTICLE N°1	90
	The effects of Mediterranean-type diet on surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis, and cholesterol levels in subjects with moderate cardiovascular risk factors.	91
	INTRODUCTION A L'ARTICLE N°2.....	119
	Cholesterol absorption status and fasting plasma cholesterol are modulated by the Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein -493 G/T polymorphism and the usual diet in women	120
	INTRODUCTION A L'ARTICLE N°3	144
	A new approach to overcome natural cholesterol interference during simultaneous determination of two stable isotope-enriched cholesterol tracers in human plasma.....	145
	DISCUSSION ET CONCLUSION	160
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	171

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCA1 : Adenosine triphosphate-binding cassette protein A1

ABCG5/G8 : Adenosine triphosphate-binding cassette protein G5/G8

ACAT : Acétyl-coA Cholestérol Acyl Transférase

AG: Acide gras

Apo : Apolipoprotéine

ARNm : Acide ribonucléique messenger

¹³C : Carbone 13

CE : cholestérol estérifié

CEL : Carboxyl Ester Lipase

CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein

CL : cholestérol libre

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

D4 : cholestérol tétradeutééré ou D4-cholestérol

D7 : cholestérol heptadeutééré ou D7-cholestérol

²H ou D : Deutérium

FABP: Fatty acid binding protein

HDL : High Density Lipoprotein

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

HOMA: Homeostasis model assessment

IBAT: Ileal sodium-dependent bile acid transporter

IDL : Intermediate density lipoprotein

IMC: Indice de masse corporelle

IV: intraveineux (se)

LCAT : Lécithine cholestérol acyl transférase

LDL : Low density lipoprotein

LDL-R : Low density lipoprotein receptor

LH : Lipase hépatique

LPL : Lipoprotéine Lipase

LRP: Low density lipoprotein receptor related protein

LXRs: Liver X receptors

MCV: Maladies cardio-vasculaires

MTP: Microsomal triglyceride transfer protein

NO: Monoxyde d'azote

NPC1L1: Niemann-Pick C1 like 1 protein

PL: Phospholipides

PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors

PTL: Pancreatic triglyceride lipase

RE: Reticulum endoplasmique

REG: Reticulum endoplasmique granuleux

REL: Reticulum endoplasmique lisse

RXRs: Retinoïd X receptors

SRE: Sterol regulatory element

SREBPs: Sterol regulatory element binding proteins

TG: Triglycerides

TRL: Triglyceride rich lipoprotein

VLDL : Very low density lipoprotein

VO: voie orale

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Formule moléculaire du cholestérol.	16
Figure 2: Structures chimiques du cholestérol et des principaux stérols végétaux.	19
Figure 3: Transporteurs et protéines intracellulaires intervenant dans l'absorption intestinale du cholestérol.	23
Figure 4: Structure et composition d'une lipoprotéine.....	33
Figure 5: Schéma simplifié du métabolisme des lipoprotéines.....	37
Figure 6: Localisation et rôle de la MTP dans l'assemblage des chylomicrons.	40
Tableau 1: Conséquences de maladies génétiques sur l'absorption intestinale du cholestérol.....	57
Figure 7: Mutations du gène <i>SAR1B</i> décrites dans la littérature.	59
Figure 8: Etapes de synthèse du cholestérol dans une cellule eucaryote.....	77
Figure 9: Formules développées et masses moléculaires des principaux phytostérols.....	78
Figure 10: Formule développée du cholestanol	79
Figure 11: Formule développée du lathostérol	79
Figure 12: Formule développée du desmostérol.	80
Figure 13: Formules moléculaires du cholestérol et de deux isotopes du cholestérol, le D7-cholestérol et le D4-cholestérol.....	83

INTRODUCTION

Les maladies cardio-vasculaires (MCV) demeurent l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés (Mathers *et al.* 2009). Un certain nombre de facteurs de risque ont maintenant été bien identifiés parmi lesquels l'hypercholestérolémie. Il est désormais généralement admis que l'élévation du LDL cholestérol augmente le risque cardio-vasculaire, tant et si bien qu'il est commun aujourd'hui de parler du « mauvais cholestérol ».

Face à ce problème de santé publique, l'intérêt porté à l'étude de l'absorption du cholestérol n'a cessé de croître et reste d'actualité avec l'arrivée de nouveaux hypocholestérolémiants (Ezétimibe), qui agissent non plus en inhibant la synthèse du cholestérol (Statines), mais par inhibition de son absorption.

Bien qu'étudiée depuis des décennies, l'absorption intestinale du cholestérol et les facteurs dont elle dépend restent à préciser. En effet, il existe une très grande variabilité d'absorption du cholestérol entre les individus, mais aussi dans une moindre mesure pour un même sujet selon les conditions. Des facteurs physiologiques, nutritionnels et génétiques interviennent dans le métabolisme du cholestérol, mais il est difficile de déterminer le lien de cause à effet, étant donné la complexité des mécanismes de régulation du cholestérol et l'implication simultanée de plusieurs facteurs (Santosa *et al.* 2007c).

Deux approches différentes, néanmoins complémentaires, peuvent être utilisées afin de mieux comprendre les facteurs intervenant dans la grande variabilité d'absorption du cholestérol chez l'homme :

- le dosage de marqueurs plasmatiques d'absorption et de biosynthèse du cholestérol, naturellement présents à l'état de traces dans le plasma (METHODE INDIRECTE) (Miettinen *et al.* 1990). Peu onéreuse, non invasive, la méthode indirecte s'applique à de grandes cohortes.
- le dosage simultané de deux isotopes du cholestérol utilisés comme traceurs, l'un administré par voie orale, l'autre par voie intraveineuse (METHODE DIRECTE) (Bosner *et al.* 1999). Cette technique, dérivée de la méthode de Zilversmit, permet de quantifier le cholestérol absorbé en

déterminant le taux d'absorption du cholestérol exogène. Elle est considérée comme la méthode de dosage de référence, mais son utilisation est limitée pour les études à grande échelle, en raison de son coût et de considérations éthiques.

Dans ce contexte, notre travail, présenté au travers de cette thèse, a consisté dans un premier temps, à étudier la variabilité d'absorption du cholestérol chez des sujets présentant un risque cardio-vasculaire modéré, recrutés pour l'étude d'intervention MEDI-Rivage. Cette étude consistait à soumettre des hommes et des femmes (18-70 ans) à deux types de régimes, l'un pauvre en cholestérol et en acides gras, l'autre méditerranéen, en vue en particulier de diminuer leur apport en acides gras saturés et d'augmenter l'apport en acides gras mono- et poly-insaturés (Vincent *et al.* 2004). Au terme des trois mois d'intervention, l'effet des régimes était proche dans les deux groupes (Vincent-Baudry *et al.* 2005), ce qui nous a permis de poursuivre notre étude sur l'ensemble de la cohorte. Afin de prendre en considération plusieurs facteurs intervenant dans la variabilité d'absorption du cholestérol et de montrer de potentielles interactions gènes-sexe-régime, les niveaux d'absorption et de synthèse du cholestérol ont été déterminés par la méthode indirecte et des associations avec des polymorphismes génétiques ont ainsi été établies dans cette population.

Les marqueurs indirects peuvent être utilisés comme des indicateurs de risque de MCV (Matthan *et al.* 2009; Weingartner *et al.* 2010) et pourraient constituer un outil diagnostique en clinique, au même titre que le niveau plasmatique de LDL-cholestérol. Par ailleurs, la connaissance du statut d'absorbeur d'un sujet paraît essentielle dans le choix de protocole thérapeutique hypocholestérolémiant (Miettinen *et al.* 2000b; Hoenig *et al.* 2006; Hiramitsu *et al.* 2010).

Mais ces marqueurs indirects présentent des limites, ce qui nous a conduit, dans un second temps, à développer et à mettre au point une méthode de dosage directe, le but étant de mesurer simultanément les marqueurs directs et indirects et de comparer les deux méthodes en vue de l'application systématique de la méthode indirecte dans différentes études chez l'homme.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Métabolisme des stérols et des lipoprotéines intestinales

1. Principaux stérols alimentaires

1.1. Cholesterol endogène et exogène

Elément structural majeur des membranes cellulaires, le cholestérol joue également un rôle prépondérant dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires, ainsi que dans celle de la vitamine D.

Dans l'organisme et les aliments, le cholestérol se présente sous forme libre (Figure 1) ou estérifiée.

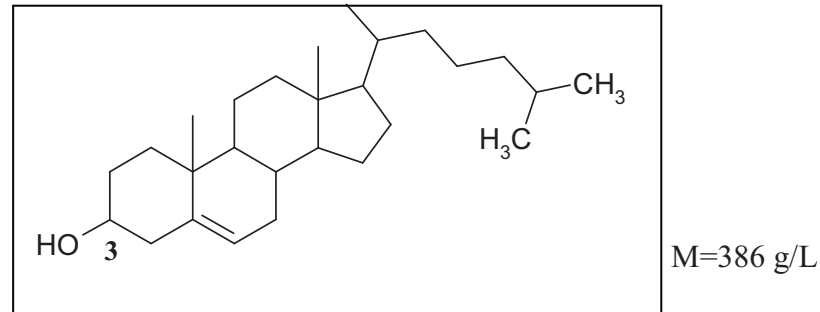


Figure 1: Formule moléculaire du cholestérol (C₂₇H₄₆O) non estérifié. 3 :position où la fonction hydroxyle peut être estérifiée.

Le cholestérol libre appartient à la classe des lipides amphiphiles, insolubles dans l'eau, mais capables de former une monocouche à l'interface air-eau. Il peut être toxique pour la cellule (Tabas 2002). Des quantités excessives de cholestérol peuvent en effet altérer les fonctions membranaires de la cellule en précipitant sous forme de cristaux, provoquant la mort cellulaire et des dépôts athéromateux lorsqu'ils se retrouvent dans la circulation sanguine (Small *et al.* 1974). Le cholestérol estérifié par un acide gras en position 3 fait partie de la classe des lipides apolaires, non solubles dans l'eau.

Dans la circulation sanguine, 70 à 80% du cholestérol est sous forme estérifiée, alors que dans les aliments, le cholestérol est majoritairement sous forme libre associé aux phospholipides. En effet, seulement 10 à 15 % du cholestérol alimentaire est estérifié (Iqbal *et al.* 2009), le plus souvent avec l'acide oléique, mais ce taux peut s'élever à 30% car il dépend de la matrice alimentaire dans laquelle se trouve le stérol, ainsi que de la technique d'extraction utilisée dans l'étude (Wilson *et al.* 1994).

Chez l'homme, on distingue le cholestérol exogène, d'origine alimentaire, et le cholestérol endogène issu de réactions de biosynthèses ou de dégradation.

La majorité du cholestérol endogène est issue de la synthèse que réalisent continuellement les hépatocytes et les entérocytes. Au cholestérol néosynthétisé, s'ajoute le cholestérol provenant des bactéries intestinales mortes ou de la desquamation des cellules (Wilson *et al.* 1994). La plupart des cellules de l'organisme possèdent l'équipement enzymatique requis pour synthétiser le cholestérol, mais le foie demeure l'organe central de gestion du métabolisme du cholestérol et des autres lipides. Il se situe au carrefour des différentes voies métaboliques des lipides.

Le foie orchestre le transport des lipides vers les tissus périphériques en les intégrant dans de nouvelles lipoprotéines. On parle de la **voie endogène d'apport**. Il intervient également dans la **voie entéro-hépatique**, c'est-à-dire le transport des lipides exogènes de l'intestin vers le foie, ainsi que dans le **transport inverse du cholestérol** ou voie de retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

Un régime de type occidental apporte en moyenne 200 à 600 mg de cholestérol par jour (Ros 2000). A ce cholestérol d'origine exogène s'ajoutent environ 1000 mg de cholestérol endogène d'origine biliaire, exclusivement sécrété sous forme libre (Wilson *et al.* 1994). Le cholestérol de ces deux sources se retrouve sous forme libre dans la lumière intestinale pour y être partiellement absorbé après avoir été incorporé dans des micelles mixtes, composées de sels biliaires, de lipides (principalement des phospholipides et des produits de la digestion des triglycérides) et de stérols (cholestérol et phytostérols). Pourtant, indépendamment de la quantité de cholestérol

ingérée, si toutefois elle ne dépasse pas 600mg/j (Bosner *et al.* 1999), le taux d'absorption du cholestérol chez l'homme est extrêmement variable (Sehayek *et al.* 1998a; Ostlund *et al.* 1999). Certains individus absorbent 20-30 % du cholestérol alimentaire, alors que d'autres en absorbent 80%, la moyenne étant d'environ 50% (Bosner *et al.* 1999). De nombreux facteurs environnementaux et génétiques sont à l'origine de cette amplitude.

1.2. Les phytostérols

Les phytostérols sont les analogues végétaux du cholestérol. Ils n'en diffèrent que par leurs chaînes latérales en C24 (addition de groupements méthyle ou éthyle et/ou présence d'une double liaison). Ils se concentrent plus particulièrement dans les graines et fruits oléagineux, ainsi que dans les huiles qui en dérivent (Moreau *et al.* 2002). Le plus abondant est le β -sitostérol, suivi du campestérol, du stigmastérol et dans une moindre mesure de l'avénastérol et du brassicastérol (Figure 2).

Comprises entre 200 et 400 mg/jour (Weihrauch *et al.* 1978), les quantités ingérées de phytostérols sont du même ordre de grandeur que celles de cholestérol dans un régime de type occidental (Ostlund 2002; Andersson *et al.* 2004; von Bergmann *et al.* 2005). Le terme générique de « phytostérols » englobe souvent les phytostérols et les phytostanols, qui sont leurs analogues hydrogénés par hydrogénation de la double liaison du cycle B du phytostérol. Les phytostanols sont nettement moins abondants dans la nature (Weihrauch *et al.* 1978).

Les mammifères étant incapables de synthétiser ces molécules, les concentrations plasmatiques des phytostérols dépendent uniquement de leurs taux d'absorption (de 0,4 à 3,5% (Calpe-Berdiel *et al.* 2009), le campestérol ayant le taux le plus élevé (Ostlund *et al.* 2002a). Une relation inverse avait cependant été établie entre la dose de sitostérol ingérée et son taux d'absorption, suggérant que ce taux est limitant à haute dose (Salen *et al.* 1970). Bien que ces taux soient de faibles amplitudes, leur variabilité inter-individuelle peut être importante, mais stable pour un individu, à condition qu'il n'y ait pas de changement de régime alimentaire (Plat *et al.* 2005a).

Les concentrations plasmatiques des phytostérols sont d'autant plus faibles qu'une fois absorbés, ils sont rapidement excrétés par le foie (Sudhop *et al.* 2002b). Au total, on ne retrouve qu'un pour cent des phytostérols de départ sous forme circulante (Salen *et al.* 1970) (Ostlund *et al.* 2002a), ce qui correspond à des concentrations plasmatiques 500 à 20000 fois plus faibles que celle du cholestérol (von Bergmann *et al.* 2005).

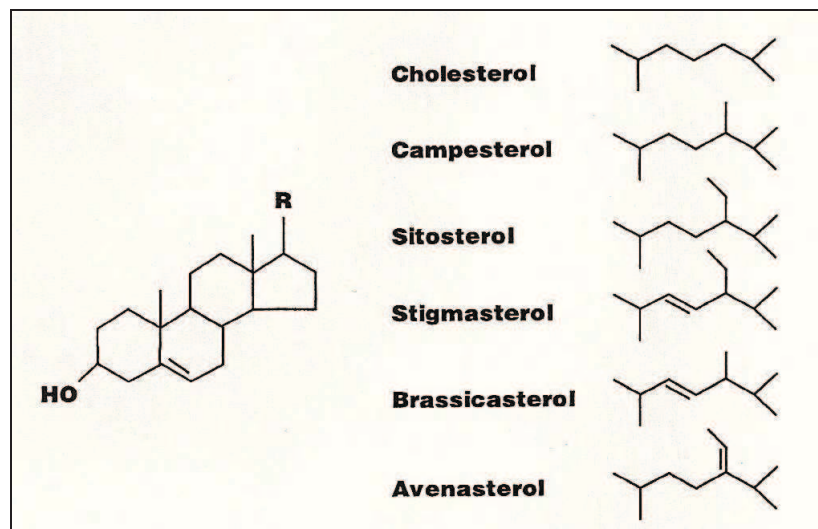


Figure 2: Structures chimiques du cholestérol et des principaux stérols végétaux (d'après (von Bergmann *et al.* 2005)).

1.3. Digestion et absorption des stérols alimentaires

1.3.1 Digestion du cholestérol et des phytostérols

Afin d'être absorbés, les stérols doivent être préalablement hydrolysés par des enzymes gastriques et intestinales.

Dans l'estomac, le cholestérol et les phytostérols sont émulsifiés dans des globules lipidiques grossiers (5-40 μm de diamètre) contenant également des triglycérides, des phospholipides et des vitamines liposolubles (Armand *et al.* 1996). Cette émulsion lipidique se forme grâce aux mouvements péristaltiques induits par la présence des aliments dans l'estomac.

Au terme de la lipolyse gastrique (et dès la première heure qui suit l'ingestion), la taille des gouttelettes des émulsions est réduite au tiers, ce qui accroît l'interface lipide/eau et favorise l'action des lipases d'origine pancréatique (Armand *et al.* 1994).

Dans l'intestin, les lipases sont déversées dans l'ampoule duodénale afin de réduire la taille des gouttelettes lipidiques en micro-émulsions. Phospholipides, triglycérides, esters de phytostérols et de cholestérol sont principalement hydrolysés par la « Pancreatic Triglyceride Lipase » (PTL), les « Pancreatic Lipase Related Protein 1 et 2 » (PTLRP-1 et -2) et la « cholestérol estérase » ou « carboxyl ester lipase » (CEL). Cette dernière possède un large spectre d'activité, d'où les multiples noms qui lui ont été attribués (Bile Salt Dependant Lipase ou *BSDL*, carboxyl ester hydrolase, cholesteryl ester hydrolase, rétinyl ester hydrolase)(Lombardo *et al.* 1980a; Lombardo *et al.* 1980b).

Au terme de la lipolyse, les stérols libres constituent des micro-émulsions avec les autres lipides hydrolysés (triglycérides, phospholipides, acides gras, monoglycérides et lysophospholipides plus ou moins ionisés), puis ils sont solubilisés dans la lumière intestinale sous forme de micelles mixtes avec des sels biliaires (Hernell *et al.* 1990; Yao *et al.* 2002) sans lesquels l'absorption par l'entérocyte ne peut se faire (Shen *et al.* 2001; Voshol *et al.* 2001). En raison d'une plus grande hydrophobicité et parce que les phytostérols sont des molécules chargées, l'affinité des phytostérols pour les micelles est supérieure à celle du cholestérol. Ces différences physico-chimiques ont pour effet de déplacer le cholestérol des micelles mixtes et de limiter l'absorption intestinale du cholestérol (Ostlund 2002), d'où le développement de produits alimentaires enrichis en phytostérols dans les années 2000 pour diminuer la cholestérolémie.

Par ailleurs, l'usage des séquestrants biliaires (Cholestyramine) comme hypo-cholestérolémiant illustre l'importance des sels biliaires dans le processus d'absorption du cholestérol. Les sels biliaires confèrent une certaine stabilité et permettent le transport du cholestérol et des phytostérols aux abords de la bordure en brosse des entérocytes. En leur absence, on a démontré que le cholestérol n'était pas absorbé (Wilson *et al.* 1994) et l'on retrouve des structures

insolubles précipitées dans le duodénum (Armand *et al.* 1996), ainsi que des cristaux de cholestérol dans les fèces. Le taux d'absorption du cholestérol est par ailleurs directement corrélé au pool total d'acides biliaires (Ponz de Leon *et al.* 1981).

1.3.2 Absorption intestinale du cholestérol et des stérols

a) Captation entérocytaire

Les micelles mixtes ne sont pas captées telles quelles par l'entérocyte. Les lipides qui y sont solubilisés se dissocient de la micelle avec des taux d'absorption qui leur sont propres, dépendant de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, le taux d'absorption moyen du cholestérol (environ 50% (Bosner *et al.* 1999)) est largement inférieur à celui des acides gras (80-85%, voire 96% pour certains acides gras insaturés (Jones *et al.* 1985)), ce qui suggère des mécanismes d'absorption différents en relation avec le degré d'hydrophobicité de la molécule.

Les stérols sont principalement absorbés au niveau du duodénum et du jéjunum proximal, alors que les sels biliaires sont captés par les cellules iléales distales (Field *et al.* 1990). Avant de pouvoir traverser la bordure en brosse des cellules intestinales, les stérols doivent franchir une fine barrière aqueuse (50-500 μ m d'épaisseur). Il s'agit de la couche d'eau non agitée, qui est adjacente à la surface luminale des entérocytes (Westergaard *et al.* 1976). C'est au cours de cette étape que les lipides se dissocient de la micelle. Les sels biliaires vont faciliter le transfert des stérols vers la bordure en brosse de l'entérocyte en diminuant la résistance de la couche d'eau non agitée, pour maintenir la majorité des stérols sous forme de monomères. Par ailleurs, l'environnement acide de la couche d'eau non agitée permet la dissociation micellaire et la protonation des acides gras, ce qui facilite leur diffusion au travers de la membrane entérocytaire. Ce n'est pas le cas du cholestérol qui ne peut être ionisé. Les acides gras sont ainsi plus efficacement absorbés que les monomères de cholestérol, ce qui explique en partie la différence du taux d'absorption entre acides gras et cholestérol (Thomson 1980; Wilson *et al.* 1994).

Les mécanismes par lesquels le cholestérol et les phytostérols traversent la bordure en brosse et sont pris en charge par l'entérocyte sont toujours en cours d'investigations (Iqbal *et al.* 2009). Une fois dans l'entérocyte, on sait que les stérols sont en partie estérifiés par l'Acétyl CoA Cholestérol Acyl Transférase (ACAT) et en partie re-excrétés sous forme libre vers la lumière intestinale, via les transporteurs « ATP-binding cassette G5 et G8 » (ABCG5/G8). D'autres protéines interviennent dans le processus d'absorption des stérols. Elles ont été largement étudiées depuis leurs découvertes sans que l'on n'ait pu établir un rôle direct de l'une d'entre elles dans le captage du cholestérol.

Il s'agit de la protéine « Niemann-Pick C1 Like 1 » ou NPC1L1, des transporteurs ABCG5/G8 et ABCA1, du « récepteur scavenger de classe B1 » ou SR-B1, et du récepteur CD36.

b) Transporteurs impliqués dans l'absorption intestinale des stérols

Pendant longtemps, on a considéré que l'absorption du cholestérol se faisait par diffusion passive, selon un gradient de concentration. Malgré une importante analogie de structure entre les stérols végétaux et le cholestérol, le taux d'absorption du cholestérol est au moins cent fois supérieur à celui des phytostérols (Salen *et al.* 1970). Par ailleurs, des études ont montré que le transport du cholestérol à partir de micelles mixtes ou de vésicules membranaires de bordure en brosse suivait une cinétique d'ordre 2 et était sensible à l'action de protéases (Thurnhofer *et al.* 1990). Ces observations ont été le point de départ de plusieurs hypothèses, remettant en cause le modèle de diffusion passive du cholestérol au travers de la membrane entérocytaire, en faveur d'un processus régulé par de nombreux gènes et récepteurs membranaires (Lammert *et al.* 2005). De rares maladies génétiques affectant le métabolisme du cholestérol et/ou les concentrations sériques des phytostérols (maladie de Niemann Pick de type C, maladie de Tangier et sitostérolémie), ainsi que l'utilisation de modèles animaux déficients en certains gènes, ont permis l'identification de transporteurs et une meilleure compréhension des mécanismes impliqués (Figure 3).

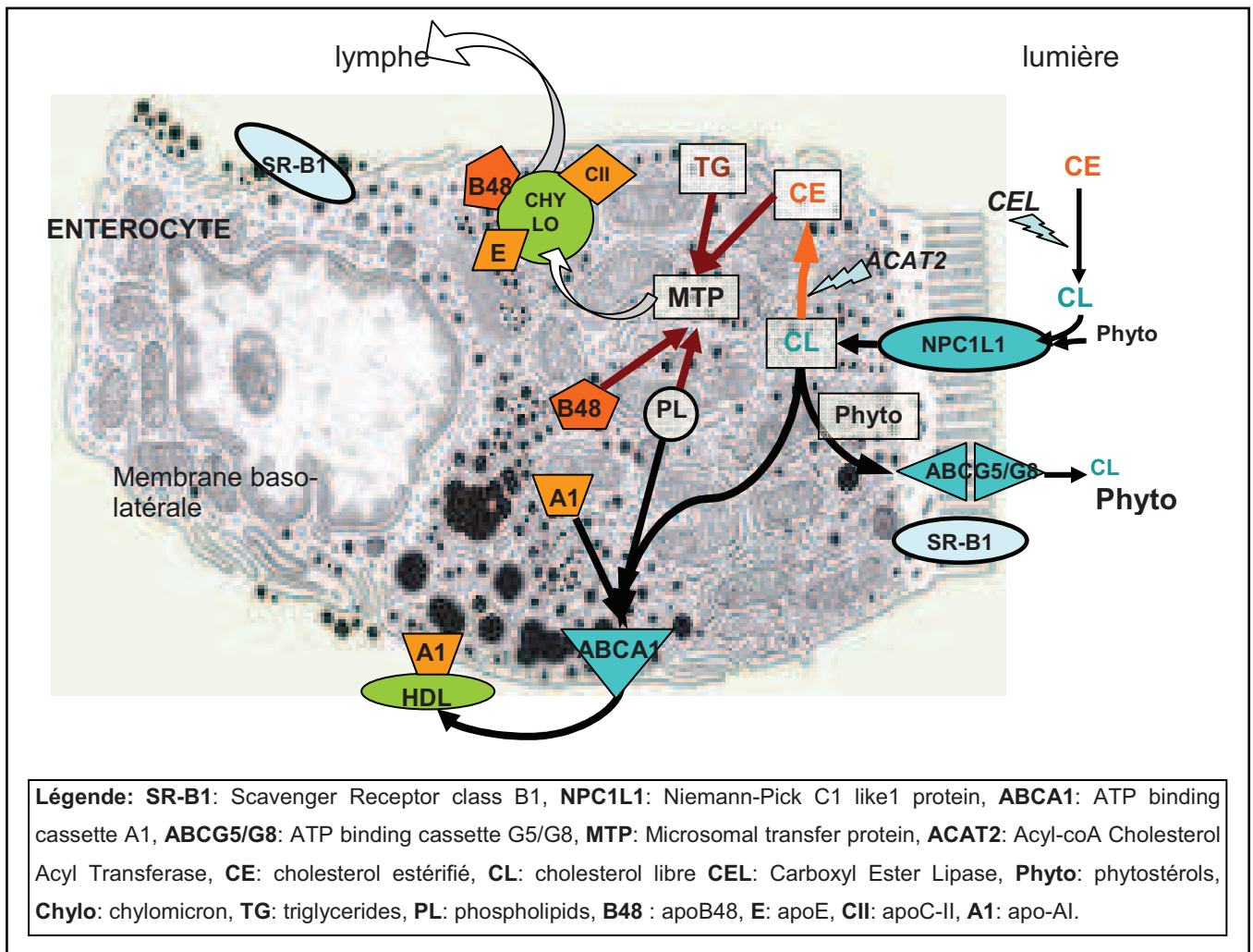


Figure 3 : Transporteurs et protéines intracellulaires intervenant dans l'absorption intestinale du cholestérol.

◆ NPC1L1

L'avènement d'une nouvelle classe d'hypocholestérolémiant (Ezetimibe) (Knopp *et al.* 2003) a permis de découvrir récemment le transporteur NPC1L1, cible moléculaire de l'Ezetimibe, et de mettre en lumière le rôle de cette protéine dans l'absorption des stérols (Altmann *et al.* 2004) ; (Garcia-Calvo *et al.* 2005).

NPC1L1 possède 13 domaines trans-membranaires, une séquence signal et plusieurs sites de glycosylation en NH₂-terminal, en somme, toutes les caractéristiques d'une protéine membranaire. Elle possède également un domaine sensible aux stérols ou « Sterol-sensing domain ». Quant au promoteur du gène *NPC1L1* codant pour cette protéine, il comporte un

élément de réponse aux stérols ou « sterol response element » (SRE). Autant d'éléments qui laissent supposer son implication dans l'absorption du cholestérol. En effet, l'expression cellulaire de la protéine est stimulée par la déplétion en cholestérol (Huff *et al.* 2006) et augmente conjointement avec l'absorption du cholestérol au niveau du duodénum et du jéjunum où elle est maximale. Inversement, un repas riche en cholestérol, inhibe l'expression de NPC1L1 chez la souris (Huff *et al.* 2006). Bien que sa présence ait été montrée à la surface des entérocytes au niveau de la bordure en brosse (Altmann *et al.* 2004; Garcia-Calvo *et al.* 2005; Iyer *et al.* 2005), Ioannou *et al.* la localisent essentiellement dans les membranes intra-cellulaires (Davies *et al.* 2005). Sa translocation vers la membrane plasmique serait secondairement induite par la privation de cholestérol (Yu *et al.* 2006). NPC1L1 pourrait alors capter le cholestérol libre au niveau de la membrane plasmique puis, une fois le complexe internalisé par endocytose, le transporter vers le réticulum endoplasmique où le cholestérol est estérifié, puis associé aux lipoprotéines naissantes (Field *et al.* 2007).

Il est maintenant admis que NPC1L1 transite entre la surface cellulaire et les compartiments intra-cellulaires et qu'elle joue un rôle essentiel dans l'internalisation du cholestérol de la membrane plasmique par endocytose médiée par les puits à clathrine (Ge *et al.* 2008; Yu 2008).

On sait également que NPC1L1 est un transporteur de phytostérols. En 2004, Davis *et al.* montraient déjà chez la souris déficiente en NPC1L1, que ce récepteur était impliqué dans l'absorption des stérols végétaux et que son affinité était plus faible pour les phytostérols que pour le cholestérol (Davis *et al.* 2004). NPC1L1 est en effet capable de discriminer les stérols animaux et végétaux (Brown *et al.* 2007), à l'inverse des transporteurs ABCG5/G8 (Betters *et al.*). Depuis, d'autres études ont confirmé ces résultats (Ge *et al.* 2008; Yu 2008; Davis *et al.* 2009). Tang *et al.* ont établi le rôle essentiel de ce récepteur, qui constitue une voie d'entrée majeure des phytostérols dans l'organisme (Tang *et al.* 2009). Par ailleurs, l'Ezetimibe permettrait de traiter la sitostérolémie par l'action inhibitrice qu'il exerce sur NPC1L1 (Tsubakio-Yamamoto *et al.* ; Salen *et al.* 2004).

◆ **Les transporteurs ATP-binding cassettes ou « ABC transporteurs »**

ABCG5/G8 et ABCA1 appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC qui, en hydrolysant l'ATP, vont pouvoir transporter, au travers de la membrane plasmique, de multiples substrats et notamment des lipides. Bien que participant à l'efflux des stérols, ils jouent un rôle non négligeable dans le processus d'absorption intestinale du cholestérol et des phytostérols.

• **ABCA1**

Des mutations dans le gène codant pour le récepteur ABCA1 sont à l'origine de la maladie de Tangier (Remaley *et al.* 1999), décrite pour la première fois par Hoffman il y a plus de 40 ans (Hoffman *et al.* 1965). Cette maladie génétique co-dominante se caractérise par une sévère déficience en HDL chez les hétérozygotes, voire l'absence totale de HDL plasmatiques dans les cas d'homozygoties (Rust *et al.* 1999), impliquant le rôle prépondérant d'ABCA1 dans la biogenèse de ces lipoprotéines.

Mc Neish *et al.* ont été les premiers à proposer l'implication d'ABCA1 dans la régulation de l'absorption du cholestérol en montrant que celle-ci augmentait modérément chez les souris ABCA1^{-/-} après ingestion d'un repas riche en matières grasses et en cholestérol (81 ± 9 % versus 69 ± 6 % chez les souris contrôles) (McNeish *et al.* 2000). A l'inverse, Drobnik *et al.* décrivaient une diminution de l'absorption du cholestérol, quantifiée par la technique de double marquage isotopique chez la souris ABCA1^{-/-} (Drobnik *et al.* 2001). Mulligan *et al.* observaient quant à eux, un taux d'absorption inchangé chez le poulet Wisconsin Hypo-Alpha Mutant (WHAM) après gavage de cholestérol radioactif (Mulligan *et al.* 2003). Ces deux études suggèrent qu'ABCA1 agirait uniquement au niveau baso-latéral de l'entérocyte et non sur la membrane apicale, comme on le pensait au départ (Repa *et al.* 2000b). Par ailleurs, une étude réalisée sur des souris dépourvues de récepteurs ABCA1, spécifiquement et uniquement dans l'intestin, a permis de mettre en évidence une diminution de 30% du pool plasmatique de HDL, qui s'accompagne d'une faible absorption du cholestérol, ce qui indique qu'ABCA1 contribue au tiers du pool de

HDL. C'est dire l'importance d'ABCA1 dans la biogenèse **intestinale** des HDL (Brunham *et al.* 2006). Cela suggère également que les HDL intestinales sont sécrétées directement dans la circulation sanguine et non dans la lymphe, qu'elles peuvent toutefois rejoindre secondairement. L'ensemble de ces mécanismes de transport du cholestérol via l'ABCA1 constitue la voie apo-B indépendante (Iqbal *et al.* 2003) (cf chap.1 § 2.2.2 c).

Non seulement ABCA1 assure l'efflux du cholestérol des cellules périphériques vers le foie, en contribuant à la formation des HDL, mais il participe également à **l'absorption intestinale** du cholestérol en assurant l'efflux baso-latéral du cholestérol, mais aussi celui des phytostérols (Field *et al.* 2004; Calpe-Berdiel *et al.* 2006) en les intégrant aux HDL plasmatiques (Hussain *et al.* 2005; Calpe-Berdiel *et al.* 2009). De plus, quand on administre de fortes doses de phytostérols chez la souris déficiente en ABCA1, on observe une diminution de l'absorption du cholestérol similaire aux souris contrôles ce qui indique que l'effet hypocholestérolémiant des phytostérols ne se fait pas par la voie de transport apo-B indépendante, incluant ABCA1 (Calpe-Berdiel *et al.* 2006).

- **ABCG5/G8**

Les ATP-binding cassettes G5/G8 sont actifs sous forme d'hétérodimères (Graf *et al.* 2002) et jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'absorption des stérols (Lee *et al.* 2001). Enchâssés dans la membrane apicale des entérocytes et des hépatocytes, ils se localisent principalement au niveau de l'intestin grêle et des canalicules biliaires hépatiques (Klett *et al.* 2004a). Ils limitent l'absorption des phytostérols et du cholestérol en facilitant l'efflux des stérols libres du cytoplasme vers la lumière intestinale ou vers la bile. Des mutations de leurs gènes sont responsables de sitostérolémies ou phytostérolémies (Berge *et al.* 2000), qui inactivent ABCG5/G8. Ces maladies autosomiques récessives sont extrêmement rares (45 cas recensés depuis 1974 (Tsubakio-Yamamoto *et al.* 2010)) et se caractérisent par l'accumulation de phytostérols dans le sang et dans de nombreux tissus, et par un risque accru d'accidents vasculaires, lié à

l'accélération du processus athéromateux. Dans cette pathologie, l'absorption intestinale des stérols végétaux est anormalement élevée (les concentrations plasmatiques peuvent atteindre jusqu'à 5g/L (Rader *et al.* 2003)) et s'accompagne d'une plus faible excrétion biliaire des stérols (Yu *et al.* 2002a). L'absorption du cholestérol est également augmentée, puisque l'efflux du cholestérol vers la lumière intestinale ne se fait plus (Berge *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001).

Chez la souris déficiente en *ABCG5/G8*, comme chez l'homme atteint de sitostérolémie, l'absorption des phytostérols augmente nettement (Klett *et al.* 2004b; Plosch *et al.* 2004) et la sécrétion biliaire du cholestérol diminue (Yu *et al.* 2002a). Néanmoins, l'efficacité d'absorption du cholestérol ne semble être que très peu affectée, alors que l'on s'attendait à ce qu'elle augmente sensiblement (Yu *et al.* 2002a). A l'inverse, l'induction pharmacologique ou la sur-expression d'*ABCG5/G8* chez la souris provoque une diminution du taux d'absorption du cholestérol, mesuré par une technique de double marquage isotopique particulièrement fiable, couplée à l'analyse des marqueurs dans les fèces (Yu *et al.* 2002b; Yu *et al.* 2003).

◆ **Les récepteurs « éboueurs » de classe B ou
« Scavenger Receptor class B »**

SR-B1 (« Scavenger Receptor » classe B type 1) et **CD36** ou **FAT/CD-36** (« Fatty Acid Translocase/ CD36») seraient impliqués dans l'absorption des lipides. L'intérêt de leur étude s'est essentiellement porté sur le cholestérol et non sur les phytostérols. A ce jour, aucune étude ne décrit le captage des phytostérols par l'un ou l'autre de ces récepteurs. Par ailleurs, la contribution respective de SR-B1 et de CD36 dans le processus d'absorption du cholestérol reste à déterminer.

• **SR-B1**

Cette protéine a d'abord été caractérisée chez le rongeur comme un nouveau membre de la famille des récepteurs « éboueurs » de la classe B, capables de lier les LDL modifiées et natives (Acton *et al.* 1994). Son homologue humain, CLA-1 (Calvo *et al.* 1993), se révèle être un

excellent accepteur de HDL, qu'il lie avec une forte affinité (Acton *et al.* 1996). SR-B1 assure la capture sélective des lipides des HDL, avec une efficacité accrue pour le cholestérol sous forme libre ou estérifiée (Thuahnai *et al.* 2001). Principalement localisé dans les tissus stéroïdogènes et le foie, SR-B1 se retrouve également le long du tractus intestinal, son expression étant alors maximale au niveau de l'intestin proximal (Cai *et al.* 2001). SR-B1 se situe au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (Hauser *et al.* 1998), mais aussi dans leur membrane basolatérale (Cai *et al.* 2001), suggérant une possible implication dans le contrôle de l'absorption du cholestérol. Ainsi, chez la souris sur-exprimant spécifiquement SR-B1 dans l'intestin, on constate une augmentation rapide de l'absorption intestinale du cholestérol (x2) et des triglycérides, déterminée par le taux plasmatique de cholestérol radioactif 3 heures après gavage (Bietrix *et al.* 2006). Ces résultats sont cependant en contradiction avec d'autres études montrant que l'absorption du cholestérol chez les souris déficientes pour le gène SR-B1 n'est que très peu affectée, suggérant que ce dernier jouerait un rôle secondaire dans le processus d'absorption du cholestérol en facilitant simplement le captage du cholestérol (Mardones *et al.* 2001; van Bennekum *et al.* 2005a; Nguyen *et al.* 2009). En supposant que l'absorption intestinale du cholestérol implique l'action combinée de plusieurs transporteurs, on peut penser que l'inactivation du gène codant pour SR-B1 chez la souris pourrait être compensée par l'action des ABC transporteurs G5/G8 (Yu *et al.* 2002b) et/ou ABCA1 (Drobnik *et al.* 2001) ou encore NPC1L1 (Altmann *et al.* 2004; Davis *et al.* 2004). D'autres mécanismes pourraient expliquer le rôle partiel de SR-B1 dans l'absorption du cholestérol. En effet, SR-B1 ne jouerait pas un rôle direct dans la captation micellaire du cholestérol au niveau apical de cellules Caco-2, mais agirait plutôt indirectement en facilitant l'efflux du cholestérol vers les micelles (Cai *et al.* 2004). Un autre mécanisme peut être envisagé au niveau hépatique, car l'excrétion biliaire du cholestérol est augmentée chez la souris sur-exprimant SR-B1 dans le foie, ce qui a pour effet de diminuer indirectement son absorption intestinale (Sehayek *et al.* 1998b).

- **CD36 ou FAT/CD-36**

Comme SR-B1, ce transporteur se localise dans de nombreux tissus, notamment dans la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle. Elle y assure la translocation intra-entérocytaire des acides gras à longue chaîne. Son rôle potentiel de transporteur de cholestérol a été suggéré dans une étude réalisée sur modèle cellulaire COS-7, qui montrait des propriétés de captation du cholestérol similaires aux cellules transfectées par SR-B1 et une sensibilité à l'Ezetimibe (van Bennekum *et al.* 2005a). D'autres résultats également obtenus chez des souris CD36^{-/-} (Nauli *et al.* 2006) (Nassir *et al.* 2007) démontrent l'importance du transporteur CD36 dans le captage du cholestérol, mais aussi dans la formation et la sécrétion des chylomicrons. Le captage du cholestérol et des acides gras est significativement réduit (-60% et -50% respectivement) au niveau du segment proximal de l'intestin des souris KO pour CD36 (Nassir *et al.* 2007) et les chylomicrons sécrétés dans la lymphe sont de plus petite taille (Nauli *et al.* 2006). Le taux d'absorption du cholestérol ne semble cependant pas être affecté, ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'autres transporteurs, notamment SR-B1, capables de compenser la diminution du captage du cholestérol. Cette hypothèse a été testée par Nguyen *et al.* chez des souris simple ou double KO pour SR-B1 et CD36 (Nguyen *et al.* 2009). Sous régime basal, les souris ne montrent pas de compensation en exprimant davantage CD36 ou SR-B1, pour les souris SR-B1^{-/-} et CD36^{-/-} respectivement. Après 3 semaines d'un régime riche en cholestérol et en matières grasses, la déficience en SR-B1 et/ou CD36 retardent l'absorption du cholestérol, qui s'effectue dans des régions plus distales de l'intestin, sans modifier la capacité d'absorption de l'intestin grêle dans son ensemble, ce qui suggère l'implication probable d'autres transporteurs qu'il reste à déterminer.

Notons toutefois que la plupart des études sont réalisées chez l'animal et que l'implication des transporteurs entérocytaires dans l'absorption du cholestérol est loin d'être totalement élucidée.

1.3.3 Implication de facteurs de transcription dans l'absorption intestinale des stérols

◆ LXR α

Les « Liver X Receptors » (LXRs) appartiennent à la super-famille des récepteurs nucléaires qui, en formant un hétérodimère avec les « Retinoid X Receptors » (RXRs), viennent activer la transcription de nombreux gènes et en particulier les ABC transporteurs. L'activation des LXRs permet de réguler la synthèse du cholestérol et des acides biliaires, le transport inverse du cholestérol et l'absorption du cholestérol par l'entérocyte.

On distingue deux sous-familles, les LXR α , dont l'expression prédomine dans le foie, l'intestin grêle, le tissu adipeux et les macrophages, et les LXR β , dont la répartition est plus ubiquitaire. Ils ont pour principaux ligands les oxystérols endogènes, qui se forment par oxydation du cholestérol intra-cellulaire et en quantité proportionnelle à ce dernier. Ils agissent ainsi comme des détecteurs (« sensor ») du cholestérol : lorsque les oxystérols, générés par l'oxydation du cholestérol excédentaire, s'accumulent dans la cellule, les LXR induisent la transcription de gènes codant pour des protéines capables soit d'inhiber l'absorption du cholestérol, soit d'éliminer la surcharge de cholestérol (Zhao *et al.* 2010), qui peut être toxique pour la cellule (Tabas 2002). L'activation des LXRs va ainsi induire une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol en augmentant l'expression :

- de transporteurs impliqués dans l'efflux apical (ABCG5/G8) (van der Veen *et al.* 2005) ou baso-latéral du cholestérol (ABCA1 (Brunham *et al.* 2006), ABCG1 (Kennedy *et al.* 2001)),
- d'enzymes de synthèse des acides biliaires (Peet *et al.* 1998),
- ou encore de protéines intervenant dans l'excrétion des acides biliaires et du cholestérol biliaire (Plosch *et al.* 2002). L'excès de cholestérol est directement et efficacement excrété par l'intestin (Kruit *et al.* 2005) par la voie des LXRs (van der Veen *et al.* 2009).

La diminution de l'expression de NPC1L1 peut aussi expliquer la baisse d'absorption du

cholestérol observée en présence d'activateurs de LXRs dans des cellules Caco-2 (Duval *et al.* 2006).

◆ PPARs

Les récepteurs nucléaires PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) interviennent également dans la régulation du cholestérol. Il en existe plusieurs classes et on distingue PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . L'activation du PPAR δ serait associée à une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol chez la souris, via la diminution d'expression de NPC1L1 (van der Veen *et al.* 2005), alors qu'aucun effet n'est observé sur l'absorption du cholestérol après activation de PPAR α (Duval *et al.* 2006).

◆ SREBPs

Les facteurs de transcription SREBP pour *sterol regulatory element binding protein* sont des acteurs majeurs de la régulation du métabolisme lipidique puisqu'ils contrôlent l'expression des gènes du métabolisme des acides gras, des triglycérides et du cholestérol (Eberle *et al.* 2004). On distingue 3 isoformes : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. L'isoforme SREBP-1a se retrouve notamment au niveau des cellules intestinales, alors que SREBP-2 est faiblement exprimé au niveau cellulaire, mais de façon ubiquitaire dans l'ensemble de l'organisme. SREBP-1a et SREBP-2 régule des gènes codant pour des enzymes de biosynthèse et des protéines de capture du cholestérol (Brown *et al.* 1999b), entre autres. Le précurseur de SREBP-2 est ancré dans les membranes du réticulum endoplasmique et forme un complexe avec les protéines SCAP, qui sont des « sensor » de cholestérol, capables de changer de conformation et de libérer le précurseur SREBP-2 lorsque la concentration intracellulaire de cholestérol diminue. Le précurseur subit ensuite un double clivage protéolytique, libérant la partie aminoterminal qui migre dans le noyau et transactive les promoteurs des gènes en se fixant aux SREs (sterol response elements). Le rôle des SREBPs est prépondérant dans la biosynthèse du cholestérol et

favorisent la capture du cholestérol au niveau hépatique en stimulant la production des LDL-R. Ceci n'a pas été décrit au niveau des entérocytes. Alrefai *et al.* ont cependant montré l'implication de SREBP-2 dans la modulation de l'expression de NPC1L1 sur modèle cellulaire Caco-2. L'expression de l'ARNm du gène *NPC1L1*, tout comme l'activité du promoteur, sont augmentées par la présence d'oxystérols endogènes (25-hydroxycholesterol) et diminuent lorsque la cellule manque de cholestérol. La surexpression de SREBP-2 transactive le promoteur du gène *NPC1L1*, dans lequel ont été identifiés deux SREs, ce qui suggère que SREBP-2 intervient dans la régulation de l'absorption du cholestérol en contrôlant l'expression de NPC1L1 (Alrefai *et al.* 2007).

2. Métabolisme postprandial des lipoprotéines

2.1. Les lipoprotéines

Les lipides alimentaires et les lipides endogènes synthétisés par le foie doivent être transportés entre les tissus et les organes pour y être métabolisés. Insolubles dans les liquides biologiques tels que le sang et la lymphe, leur transport plasmatique est alors assuré par des macromolécules hydrosolubles: les lipoprotéines.

Ces dernières constituent une vaste famille de particules subdivisée en plusieurs sous-groupes en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (taille, densité, composition lipidique, mobilité électrophorétique, pour l'essentiel).

Les **chylomicrons** et les **VLDL** (Very Low Density Lipoprotein) sont les lipoprotéines de plus faible densité et de plus grande taille. Elles contiennent principalement des triglycérides.

Les **LDL** (Low Density Lipoprotein) et **HDL** (High Density Lipoprotein) sont de densité supérieure et de plus petite taille et transportent essentiellement du cholestérol estérifié.

Cette différence de composition lipidique entre chylomicrons-VLDL d'une part et LDL-HDL

d'autre part, constitue un véritable moteur dans le métabolisme des lipoprotéines.

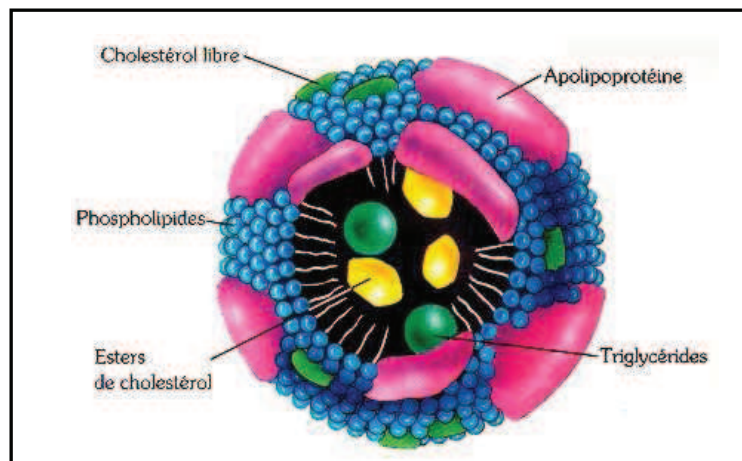


Figure 4: Structure et composition d'une lipoprotéine

([Disponible sur]:www.prevention.ch/lhyperlipedemie.htm (consulté le 23 septembre 2010)).

De structure sphérique, les lipoprotéines sont constituées d'un cœur lipidique hydrophobe, contenant des lipides apolaires (esters de cholestérol et de phytostérols, triglycérides), recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les principaux constituants sont les phospholipides, le cholestérol non-estérifié et les apolipoprotéines (apo) (Figure 4). Bien qu'il existe un facteur 100 à 1000 en moyenne entre les concentrations de cholestérol et celles de phytostérols, ces derniers sont également transportés par les lipoprotéines, les 2/3 (61%) par les LDL et 1/4 par les HDL (26%), le reste par les VLDL et IDL (Miettinen *et al.* 2003).

Les apolipoprotéines sont des protéines spécifiques à chaque classe de lipoprotéines et leur confèrent des propriétés fonctionnelles précises tout en les orientant dans les différentes voies métaboliques.

Parmi les principales classes d'apolipoprotéines (A, B, C, E) :

- les apolipoprotéines A sont généralement associées aux HDL et plus particulièrement les apo A-I et A-II, mais l'apolipoprotéine A-IV se localise également dans les lipoprotéines riches en triglycérides ;
- les apo B se localisent dans les chylomicrons, mais également dans les VLDL, les IDL et les LDL; l'apo B48 est spécifique des chylomicrons, tandis que l'apo B100 est caractéristique des

lipoprotéines synthétisées par le foie (VLDL, IDL, LDL).

- les apoE, comme les apoC, ne sont pas associées à un seul type de lipoprotéines, mais se retrouvent à la fois dans les VLDL et les HDL.

Non seulement les apolipoprotéines ont des propriétés stabilisatrices au sein des lipoprotéines, mais elles jouent également un rôle important dans l'assemblage, la sécrétion et le métabolisme des lipoprotéines, notamment par leurs interactions au niveau de récepteurs cellulaires spécifiques et par l'activation ou l'inhibition d'enzymes intravasculaires, telles que la CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein) et la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase).

2.2. Métabolisme des lipoprotéines en période postprandiale

2.2.1 Vue d'ensemble du métabolisme des lipoprotéines

Au cours de leur transit intravasculaire, les lipoprotéines font l'objet de remaniements permanents, grâce à l'action conjointe d'enzymes lipolytiques, d'enzymes de transfert, d'apolipoprotéines et de récepteurs cellulaires (Figure 5). Ces modifications permettent le transport et la distribution des lipides au sein de l'organisme.

Voie entéro-hépatique :

La quasi-totalité des triglycérides du chyme alimentaire (97 à 98 %) sont absorbés dans le duodénum et la partie proximale du jéjunum, alors qu'en moyenne, la moitié du cholestérol alimentaire atteint la circulation générale. Il faut noter que le cholestérol alimentaire n'est pas absorbé en même temps que les triglycérides d'un même repas test, mais sur plusieurs phases digestives successives (modèle des vagues) (Beaumier-Gallon *et al.* 2001). Le cholestérol issu d'un premier repas est en effet re-sécrété dans les chylomicrons au cours des trois phases postprandiales de la journée.

A partir des chylifères, les chylomicrons rejoignent le système veineux via le canal thoracique. Les apoC-II, incluses dans leur couche périphérique, permettent leur reconnaissance et leur

dégradation plasmatique médiée par la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme hydrolyse les triglycérides des chylomicrons en acides gras qui vont être captés localement par les cellules périphériques (adipocytes, cellules musculaires...) à des fins énergétiques. La lipase hépatique poursuit ce processus d'hydrolyse au niveau de ces tissus.

Les constituants de surface des chylomicrons (apoC et apoE, phospholipides, cholestérol libre), libérés suite à l'action de la LPL (Preiss-Landl *et al.* 2002), sont recyclés au niveau des HDL pour former des HDL naissantes encore appelées pré β -HDL.

Les chylomicrons résiduels ou « remnants », encore appauvris en triglycérides par action de la Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP), sont rapidement épurés par le foie (70 %) mais également par d'autres tissus tels que la moelle osseuse ou le muscle. Leur épuration se fait par le biais des récepteurs LDL (LDL-R) et LRP (LDL Receptor Related Protein) après reconnaissance de leur apo E, induisant un mécanisme d'endocytose (Brown *et al.* 1981). Les esters de cholestérol atteignent ainsi le foie pour être convertis en cholestérol et acides biliaires ou être utilisés pour la synthèse d'autres lipoprotéines, telles que les VLDL.

Voie endogène :

Les VLDL sont synthétisées de façon continue par les cellules hépatiques assurant la sécrétion permanente de triglycérides et de cholestérol d'origine endogène.

La dégradation plasmatique des VLDL est comparable à celle des chylomicrons : la lipoprotéine lipase, activée par les apoC-II présentes à la surface des VLDL, hydrolyse les triglycérides, ce qui permet un apport régulier d'acides gras aux tissus adipeux et musculaire (Goldberg *et al.* 1990). Une partie des VLDL s'enrichit en apoB100 et en apoE et subit une délipidation plus progressive pour former des structures plus petites, les IDL, qui peuvent suivre deux voies métaboliques différentes:

-la plupart des IDL sont internalisées et dégradées dans le foie via les récepteurs B/E (récepteur LDL) (Brown *et al.* 1981),

-le reste de particules IDL est dégradé dans la circulation par l'action conjointe de la LPL et de la lipase hépatique (LH) qui les transforment alors en LDL.

La reconnaissance des LDL par leurs apoB100 se fait au niveau des récepteurs B/E précédemment cités pour les IDL, mais pour les LDL, cette captation, bien que principalement hépatique, a lieu aussi dans d'autres cellules de l'organisme. Le LDL-cholestérol est ainsi distribué aux tissus périphériques, mais la majorité de ce cholestérol a une destination hépatique. Il est ainsi stocké dans le foie sous forme estérifiée ou éliminé via les sels biliaires.

Voie du transport inverse du cholestérol (TIC) :

Le rôle des HDL est d'assurer le transport du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie, où il sera également stocké ou rejeté dans les fèces. Cette voie métabolique est nommée « Transport Inverse du Cholestérol » (TIC). Elle joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose.

Les pré β -HDL sont les accepteurs initiaux du cholestérol des cellules périphériques et amorcent la première phase du TIC. De forme discoïdale, ces particules sont sécrétées par le foie ou l'intestin, mais elles peuvent également être produites suite à l'hydrolyse des TRL par la LPL ou suite au catabolisme des α -HDL ou HDL matures (Lewis *et al.* 2005). Les pré β -HDL vont s'enrichir progressivement en cholestérol libre en se fixant sur les récepteurs ABCA1 des cellules, notamment les cellules endothéliales et les macrophages (Van Eck *et al.* 2005). Une fois capté, le cholestérol est estérifié par la Lecithin Cholesterol Acyl Transferase (LCAT), dont le co-facteur est l'apoA-I constitutive des HDL, puis il est incorporé dans le corps de la lipoprotéine pour former des α -HDL sphériques (HDL₃, puis HDL₂) de plus grande taille.

Une partie des esters de cholestérol est transférée vers les lipoprotéines riches en triglycérides (IDL, VLDL et chylomicrons) par action de la CETP qui apporte en échange une quantité équimolaire de triglycérides. Les HDL vont ainsi progressivement s'enrichir en triglycérides et en apoE pour donner des HDL de grande taille qui vont subir l'action de la lipase hépatique. Les

α -HDL peuvent ensuite interagir par le SR-B1, le récepteur majeur des HDL au niveau du foie et des cellules productrices d'hormones stéroïdiennes. Il permet d'internaliser le cholestérol estérifié dans la cellule alors que les autres composants des HDL sont recyclés dans le compartiment sanguin.

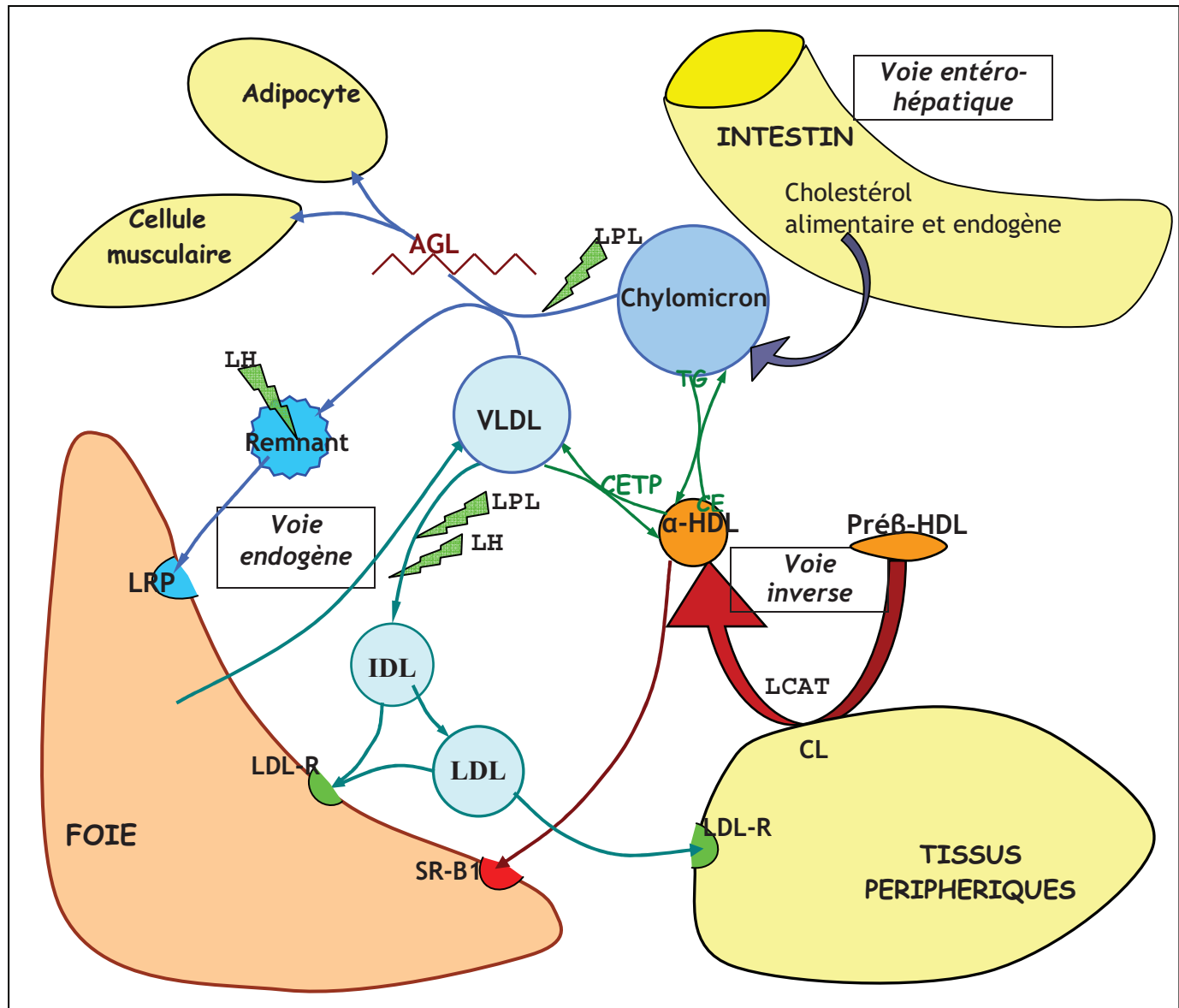


Figure 5: Schéma simplifié du métabolisme des lipoprotéines.

2.2.2 Assemblage des lipoprotéines intestinales

Une fois le cholestérol absorbé, celui-ci doit être incorporé dans les lipoprotéines intestinales afin d'intégrer la circulation générale et de pourvoir aux besoins tissulaires. Les mécanismes

impliqués dans la production des lipoprotéines ne sont pas tous élucidés, mais il a été récemment établi que le cholestérol pouvait suivre deux voies distinctes pour être incorporé aux lipoprotéines (Iqbal *et al.* 2003; Iqbal *et al.* 2005)

-la voie apo B-dépendante qui correspond à la production des chylomicrons ;

-la voie apoB-indépendante qui met en jeu l'apo A-I dans la biogenèse d'HDL intestinales.

a) Les chylomicrons

Les **chylomicrons** sont les lipoprotéines de plus faible densité et de plus grande taille, leurs dimensions variant de 75 à 450 nm de diamètre selon le taux d'absorption des lipides (Hussain *et al.* 2001). Elles sont exclusivement synthétisées par l'intestin en période postprandiale et sont donc principalement constituées de lipides alimentaires, soient 85-92% de triglycérides, 6-12% de phospholipides, 1-3% de cholestérol (endogène et exogène), de très faibles quantités de vitamines liposolubles et de stérols végétaux. Les 1-2% restants représentent les apolipoprotéines A-I, A-IV, C, E et B48, cette dernière étant un composé constitutif majeur des chylomicrons.

◆ Mécanisme d'assemblage des chylomicrons

La biosynthèse des chylomicrons débute dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG), en période postprandiale, sous la dépendance de l'apo-B48 et de protéines chaperonnes, telles que la « microsomal triglyceride transfer protein » (MTP) (Hussain *et al.* 2003a).

La synthèse de l'apo-B48 est indispensable pour initier la formation des chylomicrons. Le gène de l'apo B48 présente 48% d'analogies de séquence avec l'apo B100 (Chan *et al.* 2003). En effet, la protéine est traduite à partir de l'ARN messager de l'apo B100, mais la traduction est stoppée par la substitution d'une base catalysée par la protéine apobec-1. On parle d'« editing post transcriptionnel ». Au fur et à mesure de sa traduction, l'apo B48 est intégrée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), où elle s'oriente comme une protéine transmembranaire, ce

qui la rend accessible aux protéases à la fois du côté luminal du RE et du côté cytoplasmique (Davis *et al.* 1990).

La formation des chylomicrons peut être subdivisée en deux (Cartwright *et al.* 2001) ou trois étapes (Hussain 2000) (Figure 6).

Le modèle proposé par Hussain *et al.* est cohérent avec les auteurs qui proposent un assemblage des chylomicrons en deux étapes.

Lors de la 1^{ère} étape, l'apoB48, nouvellement synthétisée, s'associe à des phospholipides pour former des petites particules de densité similaire aux HDL (Cartwright *et al.* 2001), les lipoprotéines primordiales. L'assemblage de ces petites lipoprotéines requiert l'action de la MTP (voir ci-après).

Au cours de la 2^{ème} étape, des globules lipidiques riches en triglycérides se forment dans la lumière du REL indépendamment de la synthèse en apo-B48. En période postprandiale, ces globules lipidiques s'enrichissent en lipides en fonction des apports alimentaires, ce qui détermine ensuite la taille des lipoprotéines produites (Hussain 2000; Hussain *et al.* 2001).

La 3^{ème} étape se caractérise par l'expansion du cœur lipidique des lipoprotéines primordiales grâce à la fusion de ces dernières avec les globules lipidiques. Il s'agit du phénomène de « core expansion » qui se produit à la jonction du REL et du REG et qui aboutit à la formation de lipoprotéines de densité variable, pouvant correspondre à des VLDL ou à des chylomicrons de petites et de grandes tailles (Hussain 2000).

Les lipoprotéines produites sont ensuite transportées du REL vers l'Appareil de Golgi dans des vésicules de type COPII, dont le rôle dans le trafic REL-Golgi est connu pour d'autres molécules (Siddiqi *et al.* 2003). Les chylomicrons s'enrichissent encore en triglycérides et cholestérol, puis sont finalement directement sécrétés dans la lymphe.

Morel *et al.* font cependant état d'un trafic intracellulaire plus complexe. A l'aide de cellules Caco-2 bipolarisées, ils ont montré que l'apoB, une fois synthétisée dans le RE, était exportée via l'appareil de Golgi, vers les microvillosités apicales et que ce transport était contrôlé par les

lipides. La présence de micelles mixtes au niveau de la bordure en brosse de ces cellules entraîne ensuite le transport de l'apoB dans le sens inverse, c'est-à-dire de la membrane apicale vers la membrane baso-latérale (Morel *et al.* 2004). Que les lipoprotéines primordiales soient exportées vers la membrane apicale demeure un concept compatible avec la localisation « inhabituelle » de la MTP au niveau de la bordure en brosse (Slight *et al.* 2004), mais ces notions demandent à être davantage explorées, afin de préciser les mécanismes impliqués dans l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons.

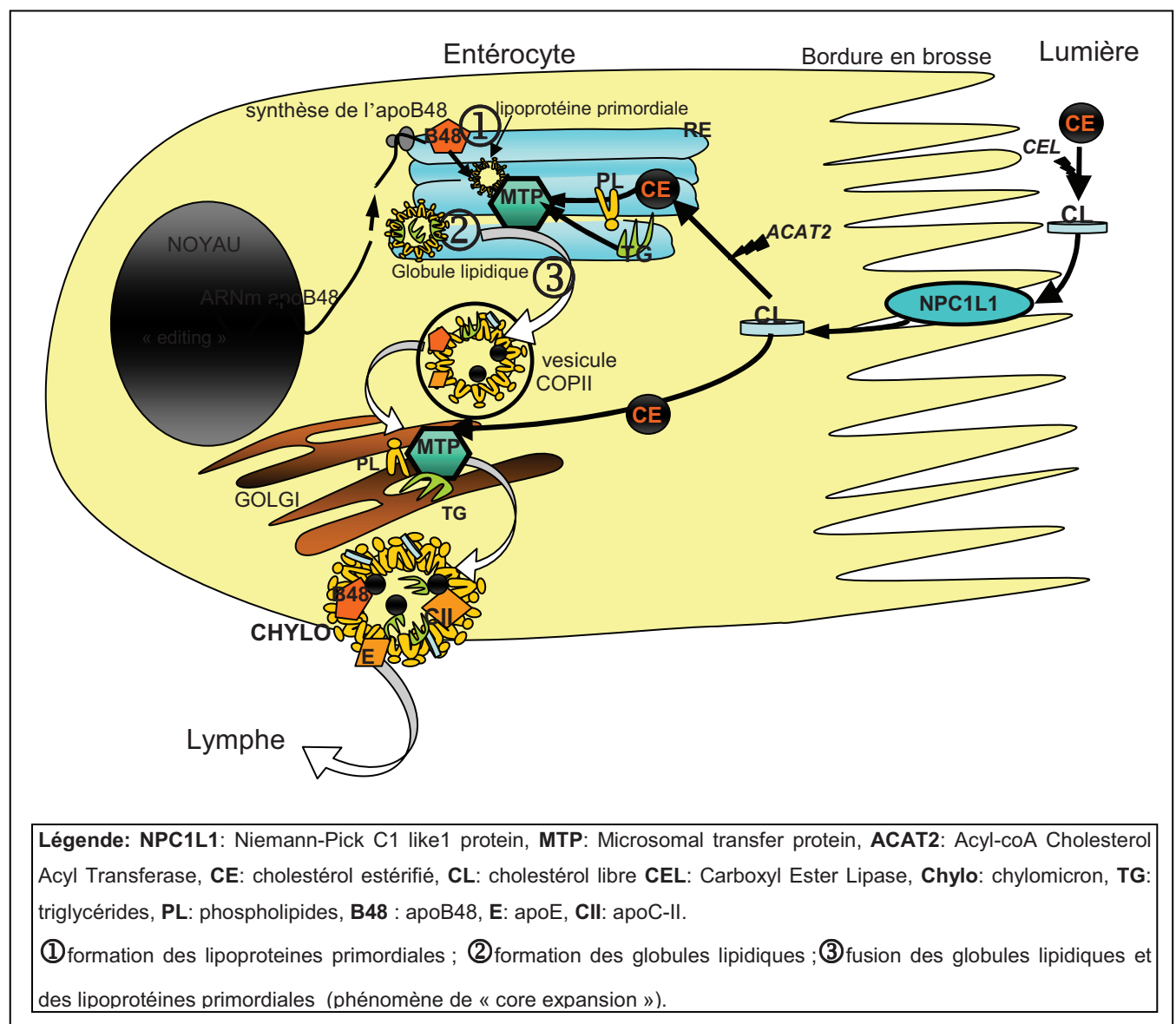


Figure 6 : Localisation et rôle de la MTP dans l'assemblage des chylomicrons.

◆ Rôle de la MTP dans l'assemblage des chylomicrons

La MTP est une protéine intracellulaire, hétérodimérique, principalement localisée dans les entérocytes et les hépatocytes, qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides (Sharp *et al.* 1993). Dans le cas d'abétalipoprotéïnémie (Wetterau *et al.* 1992; Sharp *et al.* 1993), ainsi que chez des souris MTP^{-/-} déficiente en MTP (Raabe *et al.* 1998), les chylomicrons et VLDL sont quasi-absents du plasma et les sujets souffrent de sévères malabsorptions des lipides, accompagnées d'hypocholestérolémie.

Au niveau de sa grosse sous-unité, elle catalyse le transfert de lipides neutres (Wetterau *et al.* 1990), en particulier, des triglycérides et des esters de cholestérol (Iqbal *et al.* 2008b), de la membrane du réticulum endoplasmique vers les lipoprotéines primordiales (Hussain 2000). Le transfert de lipides se réalisent grâce à la forte affinité de liaison de la MTP pour l'apo-B (Wu *et al.* 1996), ce qui permet à la MTP de conduire les lipoprotéines primordiales de la membrane du REL vers la lumière du réticulum endoplasmique, tout en assurant la protection de l'apo-B face aux diverses attaques protéolytiques (Bakillah *et al.* 2000). La MTP se localise également au niveau de l'Appareil de Golgi (Levy *et al.* 2002), ce qui suggère qu'elle soit impliquée non seulement dans la première étape de l'assemblage des lipoprotéines intestinales, mais également dans les suivantes (Hussain *et al.* 2003b), pour finalement aboutir à la formation des chylomicrons. La MTP possède donc de multiples fonctions en tant que protéine de transfert et en tant que protéine chaperonne (en liant l'apo-B et en s'associant aux lipides membranaires). Elle pourrait jouer d'autres rôles au niveau apical, puisqu'elle a également été identifiée dans la bordure en brosse des entérocytes (Slight *et al.* 2004). En outre, elle serait même impliquée dans l'immunité en régulant la biosynthèse du CD1d, une molécule présentatrice d'antigènes (Zeissig *et al.* 2010).

◆ Rôle de l'ACAT2 dans l'assemblage des chylomicrons

Environ deux tiers du cholestérol entrant dans le système lymphatique via les lipoprotéines intestinales sont estérifiés, ce qui suggère que l'estérification du cholestérol est une étape essentielle dans le processus d'absorption du cholestérol. L'acyl-coenzyme A-cholestérol acyltransferase-2 ou ACAT-2 joue donc un rôle important en catalysant l'estérification du cholestérol libre, qui peut ainsi être utilisé pour la biosynthèse des chylomicrons (Temel *et al.* 2007). L'expression de l'ACAT-2 est limitée à l'intestin grêle et au foie (Anderson *et al.* 1998; Cases *et al.* 1998), contrairement à son homologue, l'ACAT-1, dont la répartition est ubiquitaire (Chang *et al.* 1993). Par ailleurs, la liaison entre l'ACAT-2 et le cholestérol est très spécifique, car même les phytostérols, dont la structure est proche de celle du cholestérol, ne seraient pas (Field *et al.* 1983; Field *et al.* 1997) ou très peu (Temel *et al.* 2003) estérifiés par l'ACAT-2.

Les souris déficientes en ACAT-2, mises sous régime riche en cholestérol, montrent un taux d'absorption du cholestérol considérablement réduit (Buhman *et al.* 2000). Repa *et al.* montrent une réduction plus modeste du taux d'absorption du cholestérol chez des souris ACAT^{-/-}. Cela pourrait s'expliquer par la mise en place de mécanismes « compensatoires ». Comme la voie apoB-dépendante est déficiente chez les souris ACAT^{-/-}, la voie apoB-indépendante permet un efflux baso-latéral de cholestérol en sécrétant des HDL intestinales, ce qui est suggéré par un taux d'ARNm d'ABCA1 quatre fois supérieur aux souris sauvages (Repa *et al.* 2004). Ces résultats sont en accord avec ceux de Temel qui utilisent des souris simple ou double KO pour les gènes ABCA1 (-48%) et ACAT-2 (-24%) et qui montrent un effet additionnel des deux voies chez les doubles KO (-79%) (Temel *et al.* 2005).

b) Régulation de la sécrétion des chylomicrons

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation de la sécrétion des chylomicrons. Ils sont en relation avec la régulation de gènes de protéines impliquées dans la biosynthèse des chylomicrons, telles que l'apoB et la MTP.

La production des lipoprotéines intestinales peut être affectée par les niveaux de transcription des gènes *apoB* et *apoA-IV*. Des travaux sur modèles cellulaires Caco-2 ont montré que la sécrétion d'*apoB* pouvait être augmentée par le TGF- β (« transforming growth factor beta ») via l'activation des facteurs de transcription « SMAD », venant se fixer sur le promoteur de l'*apoB* (Singh *et al.* 2002). Lu *et al.* ont, quant à eux, testé l'hypothèse selon laquelle l'expression de l'*apo A-IV* augmentait la sécrétion des chylomicrons entérocytaires en réponse à l'absorption d'acides gras. Ils ont ainsi montré qu'un régime riche en matières grasses augmentait la quantité d'ARNm de l'*apoA-IV* d'un facteur 7 dans les entérocytes de porcins nouveau-nés et que la surexpression du gène *apoA-IV* augmentait la sécrétion baso-latérale des triglycérides et des phospholipides dans les chylomicrons (Lu *et al.* 2002). En effet, la taille des chylomicrons serait influencée par l'*apoA-IV*, la synthèse de cette dernière étant également induite par l'apport en lipides alimentaires (Lu *et al.* 2006). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas tous élucidés (Black 2007), mais l'*apo A-VI* pourrait intervenir lors de l'expansion du cœur lipidique des pré-chylomicrons en maintenant une tension interfaciale et une élasticité favorables à la stabilité de ces larges particules (Weinberg *et al.* 2000).

Par ailleurs, comme évoqué auparavant, l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons sont aussi régulés par la MTP. L'étude du promoteur du gène de la MTP (*MTTP*) a permis de mettre en évidence la présence d'éléments de réponse aux stérols (SRE pour « sterol response element ») au niveau desquels se lie les facteurs de transcription SREBP-1a et -2. L'expression du gène *MTTP* est régulée négativement par SREBP-1 (Hagan *et al.* 1994; Sato *et al.* 1999) et par l'insuline (Lin *et al.* 1995), alors que le cholestérol montre l'effet inverse en la régulant positivement (Hagan *et al.* 1994), ce qui conduirait dans ce cas à une augmentation de sécrétion des chylomicrons en présence de cholestérol.

Iqbal *et al.* ont également récemment montré l'implication d'une protéine du stress, l'« inositol-requiring enzyme 1beta » (IRE1 β) dans la régulation de la synthèse de la MTP et donc dans la production des chylomicrons, en utilisant des souris déficientes pour le gène de l'IRE1 β . Après

un repas riche en cholestérol et en matières grasses, les souris *Ire1b^{-/-}* présentent une hyperlipidémie associée à une plus grande sécrétion de chylomicrons et à une surexpression entérocytaire du gène de la MTP. Des cultures cellulaires ont permis de montrer que IRE1 β diminuait la quantité d'ARN messager transcrit du gène *MTTP* (en augmentant sa dégradation post-transcriptionnelle). Inversement, l'absence de IRE1 β améliore l'expression de la MTP (Iqbal *et al.* 2008a).

c) Les HDL intestinales

Le transport du cholestérol, de sa captation entérocytaire à son efflux baso-latéral, peut suivre deux voies différentes (Iqbal *et al.* 2003; Iqbal *et al.* 2005) :

- la voie apoB-dépendante qui correspond à l'assemblage et à la sécrétion des chylomicrons ;
- la voie apoB-indépendante, qui correspond à la formation des HDL intestinales avec, pour acteurs principaux, l'apo A-I et l'ABCA1, qui vont générer l'efflux du cholestérol au niveau basolatéral. 25 à 30% du cholestérol capté par l'entérocyte emprunte cette voie de transport chez la souris (Iqbal *et al.* 2005).

L'importance d'ABCA1 dans la biogenèse intestinale des HDL a été démontrée chez des souris déficientes en *ABCA1* (Brunham *et al.* 2006) (cf chapitre I § 1.3.2. b) et implicitement chez des souris *ACAT-2^{-/-}*, pour qui la voie apoB-dépendante n'est pas fonctionnelle (Buhman *et al.* 2000) (conf.§ 2.2.2 a). Temel *et al.* ont utilisé des souris simple ou double KO pour les gènes *ABCA1* et *ACAT2*. Il en résulte une diminution d'absorption du cholestérol de -48% et de -23% pour les souris *ABCA1^{-/-}* et *ACAT-2^{-/-}* respectivement, et de -79% chez les souris double KO, ce qui confirme l'existence de ces deux voies de transport du cholestérol et qui montre la prépondérance d'ABCA1 dans la régulation de l'absorption du cholestérol comparé à l'ACAT-2 (Temel *et al.* 2005). Par ailleurs, il existe des phénomènes de compensation lorsque l'une des voies n'est pas fonctionnelle : à court terme, on observe une diminution de l'absorption du

cholestérol, qui tend à s'atténuer à long terme, grâce à la compensation de la voie qui n'est pas inhibée (Iqbal *et al.* 2005).

La mise en évidence de cette voie apoB-indépendante permet d'envisager le développement de molécules visant à diminuer l'absorption du cholestérol, les inhibiteurs de la MTP, qui affectent la voie apoB-dépendante, n'ayant pas donné de résultats probants (Iqbal *et al.* 2005).

Chapitre II. Etude de la variabilité d'absorption du cholestérol chez l'homme

1. Facteurs intervenant dans la variabilité d'absorption du cholestérol

L'homéostasie du cholestérol est maintenue grâce à l'équilibre qui s'établit entre l'absorption intestinale et la synthèse du cholestérol d'une part, et la sécrétion des acides biliaires et du cholestérol d'autre part. On sait que l'absorption intestinale du cholestérol chez l'animal et l'homme n'est que très partielle, de l'ordre de 50%, mais avec une forte variabilité inter-individuelle (30-80%) chez des sujets sains (Bosner *et al.* 1999).

Quelle que soit sa source, le cholestérol absorbé est transporté jusqu'au foie, où il peut être réintégré dans de nouvelles lipoprotéines ou excrété dans les canalicules biliaires, sous forme native ou dérivée. Une fraction du cholestérol biliaire rejoint la lumière intestinale avec des acides biliaires néo-synthétisés ou ayant subi le cycle entéro-hépatique. Lorsque l'apport en cholestérol augmente, cela induit une diminution de la synthèse de cholestérol au niveau hépatique, qui s'accompagne d'une augmentation de synthèse d'acides biliaires et/ou de l'excrétion de cholestérol dans la bile (Lin *et al.* 1980; Miettinen *et al.* 1989a; Jones *et al.* 1996).

Les mécanismes de régulation ainsi mis en jeu permettent de limiter les fluctuations de cholestérol plasmatique induites par des quantités variables de cholestérol alimentaire (Hopkins 1992). On observe cependant une grande variabilité dans la réponse plasmatique en fonction de la quantité de cholestérol ingérée, liée en partie à la variabilité d'absorption intestinale du cholestérol et à la capacité de l'individu à réguler le métabolisme du cholestérol (Lin *et al.* 1980; Mistry *et al.* 1981).

Le turn-over du cholestérol et les inter-relations métaboliques qui s'établissent entre synthèse-absorption-excrétion sont le reflet de la complexité des mécanismes de régulation de l'homéostasie du cholestérol et des facteurs influençant son absorption.

1.1. Le statut physiologique

1.1.1 L'âge

La relation qui existe entre l'efficacité d'absorption du cholestérol et l'âge n'est pas clairement établie. Il peut sembler évident de penser que la capacité d'absorption du cholestérol n'est pas constante à l'échelle d'une vie humaine. Déjà le nouveau-né ne possède pas les mêmes enzymes pour digérer les lipides et la composition des sels biliaires est différente de celle de l'adulte (Lindquist *et al.* 2010).

Des études chez la souris ont montré que l'efficacité d'absorption du cholestérol augmente avec l'âge (Duan *et al.* 2006), suggérant que le processus d'absorption est donc modifié par l'âge. Une élévation du taux de cholestérol dans la bile, ainsi qu'une augmentation de la taille et de l'index d'hydrophobicité du pool d'acides biliaires pourraient en partie expliquer cette augmentation d'absorption (Wang 2002), mais les mécanismes impliqués n'ont pas fait l'objet de récentes investigations chez l'homme. Une revue relativement récente souligne une importante augmentation de l'efficacité d'absorption du cholestérol avec l'âge, mais cet effet est essentiellement montré chez l'animal (Wang 2007).

Les résultats obtenus chez l'homme sont par ailleurs assez controversés. Dans deux études (Kempen *et al.* 1991; Bosner *et al.* 1999), dont une qui utilise le double marquage isotopique pour quantifier l'absorption du cholestérol (Bosner *et al.* 1999), aucune différence n'est observée en fonction de l'âge. A l'opposé, Gylling *et al.* rapportent que les hommes de 75 ans présentent une absorption du cholestérol significativement inférieure aux hommes âgés de 50 ans vivant dans la même région de Finlande (Gylling *et al.* 1994).

On peut donc supposer que d'autres facteurs, notamment nutritionnels ou génétiques, peuvent influencer, voire masquer les variations d'absorption liées à l'âge, lorsque les apports en cholestérol sont faibles (Ros 2000). Les Finlandais ont en effet un régime alimentaire très riche en cholestérol, alors que dans l'étude de Bosner et Kempen, les apports sont peu élevés. Par

ailleurs, on sait aujourd'hui que de nombreux polymorphismes de gènes peuvent moduler l'absorption du cholestérol (cf chapitre II § 1.3.3). De plus, Duan *et al.* ont montré que l'absorption intestinale du cholestérol augmentait avec l'âge grâce à la modulation de l'expression de transporteurs intestinaux. En effet, plus les souris sont âgées, plus l'expression du gène *NPC1L1* est importante, alors que l'expression du gène *ABCG5/G8* est inhibée, favorisant ainsi l'influx du cholestérol dans l'entérocyte (Duan *et al.* 2006). Ces observations révèlent la complexité de l'étude des facteurs impliqués dans l'absorption du cholestérol.

1.1.2 Le statut hormonal : différences entre hommes et femmes

Après administration simultanée de deux isotopes stables du cholestérol (l'un par voie orale, l'autre en intraveineuse), Bosner *et al.* montrent que le taux d'absorption du cholestérol alimentaire n'est pas différent entre les hommes et les femmes (Bosner *et al.* 1999). Ces résultats sont en accord avec l'étude sur population mixte de Kempen *et al.* (Kempen *et al.* 1991). En effet, la plupart des études d'absorption qui impliquent un nombre suffisant de sujets, sont souvent réalisées uniquement chez les hommes ou parfois que chez les femmes. Il n'est donc pas aisé d'évaluer la contribution du « facteur sexe » dans la variabilité d'absorption du cholestérol.

La prévalence des maladies cardio-vasculaires est pourtant plus importante chez l'homme que chez la femme pré-ménopausée (Medina *et al.* 2003). Il est maintenant bien admis que les hormones féminines, les œstrogènes et la progestérone, influencent le métabolisme du cholestérol en modulant les niveaux de lipoprotéines circulantes. Chez les femmes en âge de procréer, le taux de LDL est plus bas et celui de HDL plus élevé que chez les hommes (Knopp 1988), alors que ces taux deviennent similaires aux hommes à la ménopause (Medina *et al.* 2003). En outre, l'augmentation du pool de TRL et de LDL chez la femme ménopausée ne serait pas liée à une augmentation de synthèse ou d'absorption du cholestérol, mais à une diminution du catabolisme de ces lipoprotéines (Matthan *et al.* 2005).

Les œstrogènes pourraient cependant moduler l'absorption du cholestérol en augmentant l'efflux hépatique des sels et des lipides biliaires (Wang *et al.* 2004b). Duan *et al.* ont aussi montré que

les œstrogènes administrées à haute dose étaient capables de stimuler l'expression du transporteur NPC1L1 au niveau de l'intestin de souris, par le biais des récepteurs à œstrogène, d'où une augmentation de l'influx de cholestérol dans l'entérocyte (Duan *et al.* 2006).

1.1.3 L'obésité

Chez les sujets obèses, le turn-over du cholestérol est important et se manifeste par une production excessive de cholestérol (Miettinen 1971) et une excrétion d'acides et de cholestérol biliaires plus élevée (Bennion *et al.* 1975; Miettinen *et al.* 2000a). Ainsi, leur niveau de synthèse élevé est associé à un niveau d'absorption bas (Miettinen *et al.* 2000a), tout comme chez les sujets affectés d'un syndrome métabolique (Chan *et al.* 2003) (Simonen *et al.* 2000) ou d'un diabète de type 2 (Simonen *et al.* 2002), qui sont généralement des individus en surpoids ou obèses. La masse grasse corporelle semble donc moduler le métabolisme du cholestérol. Cependant, d'autres auteurs ne trouvent pas de relations entre la fraction de cholestérol alimentaire absorbée (Bosner *et al.* 1999) ou le niveau d'absorption (Kempen *et al.* 1991) et l'IMC (Indice de Masse Corporelle) ou la masse grasse. Selon d'autres études, l'IMC est inversement corrélé au niveau d'absorption (déterminé par les marqueurs d'absorption) chez des sujets présentant un risque de coronaropathies (Pinedo *et al.* 2007) ou encore, positivement associé aux marqueurs de synthèse dans les cas de syndrome métabolique (Gylling *et al.* 2007). De la même façon que l'âge et le sexe, ces résultats parfois divergents peuvent être expliqués par les inter-relations qui s'établissent entre les facteurs environnementaux et génétiques. Parmi les facteurs nutritionnels, il faut considérer la quantité de cholestérol que procure le régime basal. Miettinen *et al.* mènent leurs études chez des finlandais dont le régime est riche en cholestérol (>500 mg/jour) (Miettinen *et al.* 2000a), alors que Bosner *et al.* ont mesuré le taux d'absorption du cholestérol par double marquage isotopique chez des sujets qui ingéraient en moyenne 226 mg de cholestérol/jour (Bosner *et al.* 1999).

1.1.4 Implication de facteurs intestinaux dans la régulation de l'absorption du cholestérol

a) Le transit intestinal

L'absorption du cholestérol est modulée par le temps de transit du bol alimentaire. Un transit lent va permettre l'absorption d'une plus grande quantité de cholestérol grâce à un temps de contact plus long (Ponz de Leon *et al.* 1982). Cela rend également les acides biliaires plus disponibles aux bactéries coliques qui, après biotransformation, potentialisent les propriétés détergentes des acides biliaires. Ces derniers, en suivant le cycle entéro-hépatique, vont augmenter la solubilisation du cholestérol dans les micelles mixtes et favoriser son absorption par l'entérocyte (Marcus *et al.* 1986). Une étude plus récente chez la souris déficiente en récepteur de la cholécystokinine-1 montre des résultats comparables (Wang *et al.* 2004a).

b) Rôle des sels biliaires

Le rôle essentiel que jouent les acides biliaires dans l'absorption du cholestérol est connu depuis longtemps, illustré en thérapeutique, par l'usage des séquestrants biliaires tels que la cholestyramine (Questran®), et en clinique, par la cirrhose hépatique, qui provoque une diminution de la synthèse des acides biliaires suivie d'une réduction de l'absorption du cholestérol (Ponz de Leon *et al.* 1981). Des études chez l'animal confirment également ces données cliniques. Lorsque les principales enzymes de synthèse des acides biliaires sont inhibées, telles que la 7 α -hydroxylase (CYP7A1), les souris déficientes n'absorbent que des traces de cholestérol (Schwarz *et al.* 2001), et si la voie secondaire de synthèse est touchée par l'inhibition de la sterol 27-hydroxylase (CYP27), le taux d'absorption du cholestérol passe de 54 à 4% (Repa *et al.* 2000a). Par contre, l'inhibition du cycle entéro-hépatique des acides biliaires chez la souris n'affecte que modestement l'efficacité d'absorption du cholestérol (Dawson *et al.* 2003). Les acides biliaires sont effectivement déversés dans l'intestin au niveau du duodénum, puis réabsorbés dans l'iléon grâce au transporteur IBAT (« Ileal sodium-dependent bile acid

transporter », encore nommé ASBT pour « apical sodium-dependent bile acid transporter »), qui est localisé dans la membrane apicale des entérocytes. La délétion du gène codant pour IBAT élimine ce cycle entéro-hépatique, mais il n'occasionne qu'une baisse de 20% du taux d'absorption du cholestérol (Dawson *et al.* 2003). Cela s'explique par la prépondérance de l'absorption du cholestérol dans l'intestin proximal, alors que les transporteurs IBAT se localisent principalement dans l'intestin distal. On observe par ailleurs une augmentation de synthèse des acides biliaires par le foie, consécutive à l'inhibition pharmacologique d'IBAT (Galman *et al.* 2003).

c) Rôle des enzymes pancréatiques

Le cholestérol estérifié, essentiellement d'origine alimentaire, ne peut pas être absorbé par l'entérocyte sans avoir été hydrolysé au préalable par la « cholestérol estérase » encore appelée « carboxyl ester lipase » (CEL). Cependant, lorsque le gène codant pour la CEL est déficient chez la souris, l'absorption du cholestérol n'est que faiblement diminuée (Weng *et al.* 1999; Kirby *et al.* 2002). La CEL influencerait toutefois la taille des lipoprotéines produites, qui sont plus petites chez les souris $CEL^{-/-}$, comparées aux souris $CEL^{+/+}$ et les résultats obtenus sont similaires sur modèle cellulaire Caco-2 (Kirby *et al.* 2002). A l'inverse, lorsque l'on administre un inhibiteur de la CEL chez le hamster, l'absorption intestinale du cholestérol diminue (Heidrich *et al.* 2004).

Parallèlement à l'action de la CEL, la « Pancreatic Triglyceride Lipase » (PTL) hydrolyse les triglycérides lorsqu'elle est activée par la co-lipase. Des études chez la souris $PTL^{-/-}$ ont permis de mettre en évidence le rôle de la PTL dans la régulation de l'absorption du cholestérol. L'absorption du cholestérol est en effet diminuée, suite à une réduction d'hydrolyse des TG chez les souris $PTL^{-/-}$, sans que le taux d'absorption des triglycérides ne soit modifié. En retardant l'hydrolyse des triglycérides au niveau distal, le cholestérol est entraîné avec l'émulsion lipidique vers une partie distale de l'intestin où l'absorption du cholestérol est nettement moins

efficace (Huggins *et al.* 2003). Enfin, on a montré chez l'homme que l'inhibition thérapeutique des lipases gastriques et intestinales par l'Orlistat provoquait non seulement une malabsorption des graisses, mais également une diminution du taux de cholestérol absorbé (Mittendorfer *et al.* 2001).

1.2. Les facteurs nutritionnels

Les différents nutriments du bol alimentaire (triglycérides, protéines, glucides...) peuvent moduler l'absorption intestinale du cholestérol, avant tout, dans la lumière intestinale. La nature et la quantité des composants ingérés peuvent influencer la formation des émulsions et leur hydrolyse, puis la formation des micelles et/ou la captation entérocytaire du cholestérol. Par ailleurs, les quantités de cholestérol et de triglycérides ingérées, ainsi que leur composition en acides gras (Agren *et al.* 2006), influencent la taille et la nature des chylomicrons et, par conséquent, l'enrichissement du plasma en TRL et en triglycérides. Les facteurs alimentaires sont en effet connus pour affecter le métabolisme des lipoprotéines et, en particulier, celui des chylomicrons en période postprandiale (Lairon 2008).

Les aliments, tant par leur quantité que par leur qualité, peuvent donc jouer un rôle important dans la modulation de l'absorption intestinale du cholestérol, l'homme se trouvant en période postprandiale les trois quarts du temps. De plus, le cholestérol alimentaire d'un repas est absorbé en plusieurs fois, par vagues successives, au cours de trois repas consécutifs (Beaumier-Gallon *et al.* 2001). La réponse postprandiale, qui est le résultat de l'absorption des lipides et de leur incorporation dans les chylomicrons, peut aussi être modifiée en changeant nos habitudes alimentaires, en passant par exemple d'un régime de type occidental à un régime de type méditerranéen.

Ce sont autant d'observations qui permettent de juger l'influence et l'importance des facteurs alimentaires sur l'absorption du cholestérol et la meilleure façon de le tester est de mesurer ce niveau d'absorption sous différents types de régime, lors d'interventions alimentaires.

1.2.1 Influence des lipides alimentaires sur l'absorption du cholestérol

Des études anciennes ont démontré que le cholestérol, en solution avec des sels biliaires, était mieux absorbé lorsqu'il se trouvait en présence d'acides gras et de monoglycérides (Carey *et al.* 1970; Small 1970), suggérant que l'enrichissement en lipides polaires des micelles mixtes permettait une plus grande « solubilisation » du cholestérol dans la lumière intestinale. Samuel *et al.* ont également montré que le cholestérol radio-marqué est nettement moins bien absorbé lorsqu'il est administré avec du jus d'orange, comparé au lait qui contient des acides gras. Pourtant, plusieurs études d'absorption du cholestérol ne trouvent pas d'association entre le taux d'absorption et la quantité ingérée de lipides (Kempen *et al.* 1991) ou de cholestérol (Miettinen *et al.* 1989a; Sehayek *et al.* 1998a; Bosner *et al.* 1999). La masse de cholestérol absorbée augmente avec la quantité de cholestérol ingérée, mais le taux (%) de cholestérol absorbé, sous des régimes riches en cholestérol, reste inchangé (Samuel *et al.* 1982; Sehayek *et al.* 1998a) ou diminue (McNamara *et al.* 1987). Après administration d'un repas test contenant 188 mg ou 421mg de cholestérol, on constate que la fraction absorbée (mesurée par double marquage isotopique) est inversement corrélée à la quantité de cholestérol de ce repas. Autrement dit, après un repas, plus la quantité de cholestérol ingérée est importante, plus le taux d'absorption du cholestérol diminue (Ostlund *et al.* 1999).

Il est en somme difficile d'établir des relations entre l'apport en lipides et le taux d'absorption du cholestérol, parce que celui-ci varie énormément entre les individus, ce qui confirme la nécessité des études d'intervention.

1.2.2 Régime occidental

Le régime de type occidental, qui est caractéristique des pays industrialisés, est particulièrement riche en acides gras saturés et en cholestérol, et pauvre en phytostérols et en fibres, l'apport en fruits et légumes étant faible.

Miettinen *et al.* ont largement étudié l'absorption du cholestérol dans des populations consommant habituellement d'importantes quantités de cholestérol, représentatives du régime occidental. Ils ont récemment montré que la variation des apports en cholestérol et en lipides au cours de quatre périodes d'intervention à court terme (6 semaines chacune) affectait davantage la synthèse du cholestérol que l'absorption. La quantité de cholestérol ingérée n'était pas associée au taux d'absorption quelque soit la période de régime (HC/HF (high cholesterol/high fat) vs LC/LF (low cholesterol/low fat) vs HC/LF vs LC/HF) (Nissinen *et al.* 2008b). De même, une autre étude montre qu'en passant d'un régime occidental à un régime pauvre en cholestérol et en lipides, la synthèse diminuait sans que celle-ci ne soit compensée par une augmentation de l'absorption (Santosa *et al.* 2007a). Sehayek *et al.* démontrent également que le taux d'absorption du cholestérol ne fluctue pas avec le régime qu'il soit riche ou pauvre en cholestérol et en lipides à valeur énergétique égale (Sehayek *et al.* 1998a). Mais il faut préciser que les périodes de régime étaient assez courtes (3 semaines chacune).

1.2.3 Régime méditerranéen

Le régime méditerranéen se compose traditionnellement de plats riches en légumes, huile d'olive et fruits ; la consommation de vin rouge, en particulier, et de poisson reste modérée, alors que les apports en produits laitiers et carniers sont faibles, ainsi que l'apport en sucres (Willett *et al.* 1995; Martinez-Gonzalez *et al.* 2004).

Le régime méditerranéen a largement été étudié et comparé au régime occidental en raison de ses effets bénéfiques, en diminuant le risque de MCV de 8 à 45% selon les études (Panagiotakos *et al.* 2004) (-15% dans l'étude Medi-RIVAGE (Vincent-Baudry *et al.* 2005)) et en réduisant significativement la mortalité cardio-vasculaire (Sofi *et al.* 2008).

Sur le plan qualitatif et moléculaire, ce régime se distingue par le peu d'acides gras saturés (AGS) qu'il fournit et, à l'inverse, par un apport en acides gras monoinsaturés (AGMI) important, lié notamment à l'importante consommation d'huile d'olive. Les fruits et légumes

sont aussi sources de fibres alimentaires et de phytostérols, quantitativement suffisants pour diminuer la cholestérolémie (Escurriol *et al.* 2009; Sanclemente *et al.* 2009b). Il faut d'ailleurs noter que seul cet aspect « hypocholestérolémiant » du régime méditerranéen a été étudié, car aucun travail ne relate l'effet d'un tel régime sur l'efficacité d'absorption du cholestérol.

La consommation de fibres alimentaires, les plus anciens composants « fonctionnels », est associée à un effet hypolipémiant et cardio-protecteur. Les fibres sont des polysaccharides végétaux, que l'on classe suivant leurs propriétés physico-chimiques, en particulier leur viscosité et leur solubilité. Les pectines et les gommages sont solubles, visqueuses, très fermentescibles et ont des propriétés hypolipémiantes et hypoglycémiques plus prononcées, comparées aux fibres insolubles comme la cellulose (Fernandez 2001).

Elles agissent d'abord en réduisant le captage des lipides, dont le cholestérol, et celui des acides biliaires, au niveau de la lumière intestinale. Grâce à leurs capacités de rétention d'eau, elles forment un gel qui interfère avec la diffusion du cholestérol vers les entérocytes et qui diminue son accessibilité pour être émulsionné (Minekus *et al.* 2005), ce qui se répercute sur le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. Le pool hépatique de cholestérol diminue en raison d'une baisse d'apport en cholestérol alimentaire vers le foie via les chylomicrons remnants (Fernandez 2001), mais aussi en raison d'une augmentation de l'excrétion fécale des acides biliaires. Les deux mécanismes contribuent à augmenter la synthèse hépatique d'acides biliaires et donc à diminuer la cholestérolémie (van Bennekum *et al.* 2005b).

L'effet hypocholestérolémiant des fibres serait essentiellement lié à leur viscosité, mais l'implication de protéines de régulation de l'absorption du cholestérol a également été évoquée (Rideout *et al.* 2008). On dénote en effet des variations des profils lipidiques entre les individus en réponse à la consommation de fibres qui pourraient être liées aux polymorphismes de gènes, tels que *apoE*, *I-FABP*, *LDL-R* ou encore *ABCG5/G8* (Rideout *et al.* 2008).

1.2.4 Régime supplémenté en phytostérols et phytostanols

Comme évoqué précédemment, les phytostérols issus d'aliments naturels (Escuriol *et al.* 2009; Sanclemente *et al.* 2009a) ou de produits enrichis (Plat *et al.* 2005b) ont un effet hypocholestérolémiant en diminuant l'efficacité d'absorption du cholestérol (mécanismes cf Chapitre II, § 3.1.5), ce qui abaisse secondairement et significativement le LDL-cholestérol (Sanclemente *et al.* 2009b) (-8,3% après un régime de type méditerranéen riche en noix (Escuriol *et al.* 2009) et -10 à -14% après supplémentation en phytostérols ou phytostanols (2-2,5g/j) (Plat *et al.* 2005b)). L'effet n'est pas le même selon la matrice alimentaire (Clifton *et al.* 2004), mais la forme estérifiée ou libre du stérol ne semble pas jouer tant que la molécule est correctement solubilisée dans la matrice (Katan *et al.* 2003; Richelle *et al.* 2004).

Les phytostanols, naturellement moins abondants que les phytostérols, possèdent une activité similaire lorsque l'on en ingère 2g/j (Hallikainen *et al.* 2000; Talati *et al.* 2010). De telles doses ne peuvent être atteintes dans notre alimentation quotidienne sans qu'il n'y ait eu de supplémentation. Jones *et al.* ont toutefois montré que les phytostérols réduisaient davantage les concentrations plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol, comparés aux phytostanols, après 3 semaines de supplémentation (1,84 g/j) au cours d'un régime de type occidental. Mais les variations des taux d'absorption du cholestérol, déterminés par double marquage isotopique, n'étaient pas significativement différentes entre le régime enrichi en esters de phytostérols (-36,3%) ou celui enrichi en esters de phytostanols (-26,9%) (Jones *et al.* 2000).

En dehors de tout désordre métabolique, les concentrations plasmatiques de phytostérols sont variables d'un individu à l'autre (Kempen *et al.* 1988; Glueck *et al.* 1991) et sont influencées par l'apport nutritionnel (Jones *et al.* 2000; Houweling *et al.* 2009). Tout comme le cholestérol, l'absorption des phytostérols est sous la dépendance de facteurs génétiques, qui vont non seulement contribuer à leur propre variabilité d'absorption, mais également à celle du cholestérol (Calpe-Berdiel *et al.* 2009).

1.3. Les facteurs génétiques

1.3.1 Les différences ethniques

Les différences ethniques sont autant de polymorphismes génétiques qui se transmettent au sein d'une population et qui s'expriment par divers phénotypes.

L'exemple des Indiens Tarahumara de Mexico illustre bien l'importance des facteurs génétiques et l'aspect héréditaire de la variabilité d'absorption du cholestérol. Ils présentent des concentrations plasmatiques de cholestérol particulièrement basses. Cela est dû en partie à leurs habitudes alimentaires, leur régime étant pauvre en cholestérol et en matières grasses, mais également à leur capacité d'absorption du cholestérol. Ils montrent en effet un taux d'absorption intestinal bas (27,7%) quelque soit l'apport en cholestérol. Même après un régime riche en cholestérol (900 mg/jour) ce taux ne change pas. Cette population possède également une plus grande aptitude à synthétiser des acides biliaires, ce qui se traduit par une augmentation du turnover du cholestérol (McMurry *et al.* 1985).

1.3.2 Les maladies génétiques

Le plus souvent, ce sont les manifestations cliniques de maladies génétiques rares, qui ont permis de découvrir le rôle de certaines protéines dans le processus d'absorption du cholestérol.

Les maladies génétiques impliquées, toutes trois de transmission autosomique récessive, ainsi que leurs principaux effets sur l'absorption intestinale du cholestérol sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Conséquences de maladies génétiques sur l'absorption intestinale du cholestérol

Maladies	Gènes atteints	Absorption du cholestérol	Références
Sitostérolémie	<i>ABCG5</i> ou <i>ABCG8</i> Chromosome 2	Augmentée (normo- ou hyper- cholestérolémie)	(Berge <i>et al.</i> 2000)
Abétalipoprotéïnémie	<i>MTTP</i> Chromosome 4	Diminuée (hypocholestérolémie)	(Wetterau <i>et al.</i> 1992) (Sharp <i>et al.</i> 1993)
Maladie d'Anderson	<i>Sar 1b</i> Chromosome 5	Diminuée (hypocholestérolémie)	(Peretti <i>et al.</i> 2010)

La **sitostérolémie**, encore appelée phytostérolémie, est une maladie génétique liée à des mutations des gènes *ABCG5* ou *ABCG8*. Elle est caractérisée par une captation excessive des stérols alimentaires végétaux et un défaut de leur excrétion par les voies biliaires. Les concentrations plasmatiques de ces stérols sont donc très élevées et s'accumulent dans les tissus périphériques. L'absorption du cholestérol est généralement augmentée, car l'efflux des stérols vers la lumière intestinale, via les transporteurs *ABCG5/G8*, est déficient. Plusieurs mutations à l'origine de cette maladie ont été identifiées (pour revue voir (Hazard *et al.* 2007)).

Les **abétalipoprotéïnémies** sont causées par des mutations du gène de la MTP dans la région q22-24 du chromosome 4, rendant la grosse sous-unité de cette protéine non fonctionnelle. Il s'ensuit un défaut d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines à apoB. Cette pathologie se manifeste par une malabsorption des lipides et des vitamines liposolubles et l'on observe une absence totale de chylomicrons, de VLDL et de LDL dans le plasma. L'absorption du cholestérol est en effet nettement diminuée et ne peut plus se faire par la voie apoB dépendante. Plus d'une trentaine de mutations responsables d'abétalipoprotéïnémie ont été recensées (pour revue voir (Zamel *et al.* 2008)) et deux autres ont récemment été identifiées (Chardon *et al.* 2009).

La **maladie d'Anderson**, encore appelée « chylomicron retention disease » (CRD), est une atteinte spécifique de l'absorption du cholestérol et des lipides, qui se traduit aussi par une malabsorption des lipides. Le gène *SAR1B* (ou *SARA2*) code pour la protéine SAR 1 qui, couplée au GTP, forme le complexe protéique COPII avec deux autres hétérodimères (Sec 23/24 et Sec 13/31). Ce complexe joue un rôle important dans le transport intra-entérocytaire des vésicules contenant les pré-chylomicrons. Lorsque *SAR1B* est muté, la fusion de ces vésicules, issues du RE, ne peut se faire avec les membranes de l'appareil de Golgi, ce qui provoque l'accumulation des pré-chylomicrons, sous forme vésiculaire, dans le cytoplasme de l'entérocyte.

Une revue récente présente l'ensemble des mutations responsables de la maladie d'Anderson et sont illustrées dans la figure 7, issue de cette même revue (Peretti *et al.* 2010).

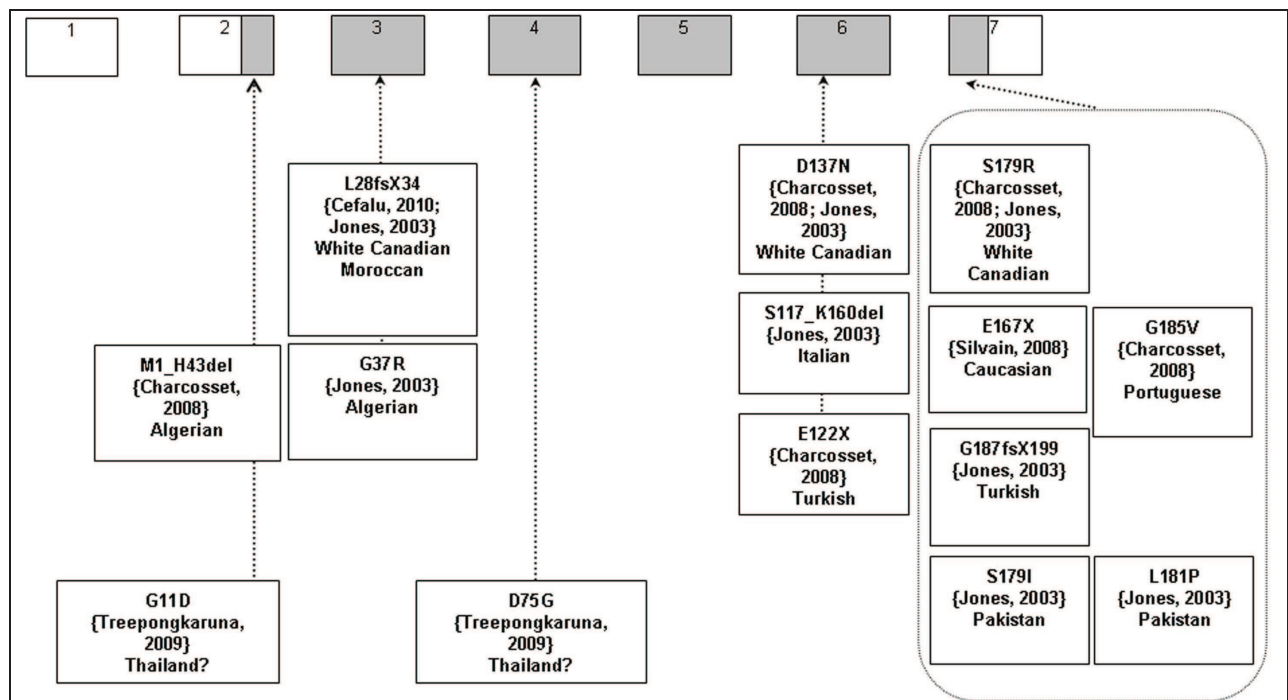


Figure 4: Mutations of SAR1B gene as described in the literature. Encoding exons are in grey colour. The nomenclature used is the same as that reported by Jones et al. [8] Sequences of SAR1B gene (NC_000005, gi: 51511721) and mRNA (NM_016103, gi: 38176155) are available on GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Only predicted consequences of mutations are presented; mutations from 5' to 3' are: c.1-4482_58 + 1406del5946ins15pb, c.32G > A, c.83-84 delTG, c.109G > A, c.224A > G, c.349-1G > C, c.364G > T, c.409G > A, c.499G > T, c.536G > T, c.537T > A, c.542T > C, c.554G > T, c.555-558dupTTAC.

Figure 7 : Mutations du gène *SAR1B* décrites dans la littérature (Peretti *et al.* 2010).

1.3.3 Polymorphismes de gènes impliqués dans le processus d'absorption du cholestérol

Toute protéine impliquée dans l'absorption du cholestérol, qu'il s'agisse d'une enzyme, d'un transporteur, d'un récepteur ou d'une protéine chaperonne, est susceptible d'affecter l'absorption du cholestérol dès lors que son expression ou son activité est modifiée. Les polymorphismes de gènes peuvent expliquer en grande partie la grande variabilité d'absorption du cholestérol entre les individus. Parallèlement au séquençage du génome humain, on s'est de plus en plus intéressé aux variations génétiques qui s'opèrent au niveau d'une seule paire de bases, au sein d'une même espèce, en étudiant des polymorphismes nucléotidiques simples ou « Single-Nucleotide Polymorphisms » (SNPs). Les SNPs représentent 90% de l'ensemble des variations génétiques humaines. Lorsque les SNPs se trouvent au sein de régions codantes (exons) la séquence d'acides

aminés de la protéine produite n'est pas obligatoirement modifiée, à l'inverse des SNPs localisés dans des introns peuvent avoir des conséquences sur l'épissage ou des facteurs de transcription. On parle de formes alléliques synonymes dans le cas où les variations alléliques d'un SNP mènent à la même séquence polypeptidique, et de formes non synonymes lorsque celle-ci est modifiée.

L'étude des polymorphismes est dense et complexe, mais quelques relations ont toutefois été établies entre des SNPs ou l'association de plusieurs SNPs et l'efficacité d'absorption du cholestérol après intervention nutritionnelle.

a) NPC1L1

Comme nous l'avons vu précédemment, NPC1L1 joue un rôle important dans l'absorption du cholestérol au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Cohen *et al.* se sont intéressés au polymorphisme du gène *NPC1L1* et à son effet modulateur sur l'absorption des stérols. Ils ont ainsi déterminés les formes alléliques non synonymes de plusieurs SNPs codant pour le gène *NPC1L1* dans deux groupes de 256 sujets faibles ou forts absorbeurs de cholestérol (comprenant chacun deux fois 64 hommes et deux fois 64 femmes de deux groupes ethniques différents, blancs Caucasiens *versus* noirs afro-américains). Le niveau d'absorption du cholestérol a été évalué par le rapport des concentrations plasmatiques du campestérol sur celles du lathostérol (marqueur d'absorption/marqueur de synthèse), un rapport élevé signifiant un taux d'absorption élevé. On trouve cinq fois plus de formes alléliques non synonymes chez les sujets faibles absorbeurs. Il semblerait que ce soit l'association de plusieurs variants génétiques rares du gène *NPC1L1* qui affecterait l'absorption du cholestérol et le taux de LDL-cholestérol (Cohen *et al.* 2006). Cette étude a été poursuivie en transfectant des cellules ovariennes-K1 de hamster Chinois (CHO) par les vingt variants non synonymes identifiés chez les faibles absorbeurs (Fahmi *et al.* 2008). Quatorze de ces variants sont associés à une très faible expression de NPC1L1 et lorsque l'on mesure l'absorption du cholestérol chez des individus faibles absorbeurs

à l'aide d'un traceur (cholestérol hexa-deuté), on constate que le taux d'absorption est diminué. Deux SNPs ont été identifiés chez ces sujets, le I647N et le R693C. La diminution de protéines NPC1L1 fonctionnelles liée à l'une ou l'autre de ces deux mutations, est associée à un taux de LDL-cholestérol plus bas, sans qu'il n'y ait de manifestation clinique.

Récemment, un autre SNP 1735C/G de *NPC1L1*, mis en relation avec les marqueurs indirects d'absorption et de synthèse du cholestérol (campesterol/sitostérol et lathostérol), a été associé au métabolisme du cholestérol (Maeda *et al.* 2010). Les Japonais homozygotes G/G présentaient une absorption plus élevée que les porteurs de l'allèle C (C/C et C/G). La réponse à un régime n'a cependant pas été testée, mais les fréquences alléliques pour ce SNP ne sont pas les mêmes entre Japonais et Canadiens. On peut supposer que l'effet du régime peut être modulé en fonction du variant, étant donné que les habitudes alimentaires sont extrêmement différentes dans ces deux pays.

Des essais cliniques chez l'homme ont également permis d'identifier des polymorphismes de *NPC1L1* qui sont impliqués dans la modulation de la réponse du cholestérol plasmatique à un traitement par Ezetimibe (l'inhibiteur spécifique de NPC1L1) plus ou moins combiné à l'administration de statines (Simon *et al.* 2005; Huff *et al.* 2006).

b) Les apolipoprotéines : l'exemple de l'apoE

Le polymorphisme de l'apoE est l'un des plus anciennement étudiés (Assmann *et al.* 1984) et sa relation avec l'efficacité d'absorption du cholestérol a été décrite il y a plus de 20 ans (Kesaniemi *et al.* 1987). On distingue les allèles e2, e3 et e4. Les homozygotes et hétérozygotes pour l'allèle e2 absorbent moins de cholestérol (et en synthétisent plus) que les porteurs de l'allèle e3 et e4, les homozygotes e4/e4 étant les plus forts absorbeurs. La différence d'affinité dans le sens E4>E3>E2 pour le LDL-R hépatique expliquerait que le taux de LDL-cholestérol soit plus élevé chez les sujets E4, grâce à un rétrocontrôle négatif de la synthèse et du captage hépatique du cholestérol (Miettinen *et al.* 1992). Bien qu'un rôle direct sur l'absorption n'ait été

décrit, on observe des variations d'absorption du cholestérol suivant le génotype de l'apoE et les quantités de cholestérol alimentaire. L'effet défavorable de l'allèle e4 ne s'exprimerait qu'en présence d'un régime riche en cholestérol (Miettinen *et al.* 1992), ce qui peut expliquer que d'autres auteurs ne trouvent pas de différences significatives de l'absorption du cholestérol entre les génotypes de l'apoE quand l'apport en cholestérol était plus faible (Kempen *et al.* 1991; Bosner *et al.* 1999; Von Bergmann *et al.* 2003). Les polymorphismes de l'apoE ont largement été associés aux variations de cholestérol plasmatique induites par le régime alimentaire, mais les résultats de ces nombreuses études sont contradictoires, minorant souvent l'effet des allèles sur les paramètres lipidiques. Récemment encore, Nissinen *et al.* montraient qu'après quatre périodes de régime de type HC/HF (high cholesterol/high fat), LC/LF (low cholesterol/low fat), HC/LF puis LC/HF, les niveaux de synthèse et d'absorption du cholestérol n'étaient pas modulés différemment par les génotypes de l'apoE (Nissinen *et al.* 2008a). Ces résultats contraires aux précédents (Miettinen *et al.* 1992) peuvent s'expliquer par le nombre plus faible de sujets homozygotes pour les isoformes e2 et e4. A l'inverse, dans un sous-groupe (1657 sujets) de l'étude EPIC, l'expression du phénotype était fonction de la quantité d'acides gras saturés ingérée, les sujets E4 ayant un risque cardio-vasculaire supérieur aux sujets E2 uniquement lorsque le régime est riche en acides gras saturés (Corella *et al.* 2010). Cette interaction gène-régime souligne l'importance des interactions entre facteurs nutritionnels, génétiques et physio-pathologiques, en particulier vis à vis du risque cardio-vasculaire.

c) MTP

Le polymorphisme le plus étudié est le SNP -493G/T qui se situe dans le promoteur du gène *MTTP*. On peut donc supposer que l'expression de la MTP peut être modulée par le variant allélique de ce SNP, ce qui régulerait, dans un sens ou dans l'autre, l'assemblage des lipoprotéines intestinales et le flux de cholestérol entrant dans le foie. Les études de polymorphismes ne montrent cependant que des associations avec les lipoprotéines et les

résultats obtenus sont souvent contradictoires : certains auteurs ne trouvent aucune association entre le niveau de LDL-cholestérol et le génotype (Herrmann *et al.* 1998; Couture *et al.* 2000), alors que d'autres montrent un taux plus élevé (Juo *et al.* 2000) ou à l'opposé, plus bas (Karpe *et al.* 1998; Bjorn *et al.* 2000; Lundahl *et al.* 2006) avec l'allèle T, qui possède la fréquence allélique la plus faible.

Finalement, la variabilité de la réponse à un régime selon les génotypes du gène *MTTP* n'a été testée que dans l'étude MEDI-Rivage (Gastaldi *et al.* 2007), tout comme la modulation de l'absorption du cholestérol avant et après intervention nutritionnelle (cf. article n°2).

d) ATP-binding cassette transporters G5 et G8

Soulignons que la plupart des études associent des SNPs avec le niveau d'absorption du cholestérol, mais sans modification du régime. Gylling *et al.* ont évalué les niveaux d'absorption du cholestérol en mesurant les marqueurs indirects chez 263 sujets avec un régime basal de type occidental. Ils ont trouvé une association entre l'allèle 19H du gène *ABCG8* et un faible niveau d'absorption du cholestérol, qui se traduisait par un taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol bas (Gylling *et al.* 2004). Santosa *et al.* ont été les premiers à montrer que les modifications du métabolisme du cholestérol, induites par un changement de régime (riche *versus* pauvre en matières grasses), étaient associées à des variants alléliques des gènes *ABCG5* et *ABCG8* chez des Canadiennes (Santosa *et al.* 2007b). La sensibilité du régime a donc été testée en fonction des génotypes des sujets. Pour cela, le coefficient d'absorption du cholestérol a été mesuré par double marquage isotopique (D7 en IV/¹³C *per os*). Celui-ci diminuait davantage chez les homozygotes qui possédaient les variants rares des SNPs Q604E du gène *ABCG5*, comparé aux hétérozygotes et aux homozygotes porteurs des variants communs. Parallèlement, leur synthèse de cholestérol augmentait davantage après perte de poids. Dans cette étude, les SNPs du gène *ABCG8* étaient associés à des variations du taux de synthèse du cholestérol.

Cependant, une méta-analyse étudiant cinq SNPs d'ABCG5/G8 chez plus de 3000 sujets, montrait finalement peu d'effets de ces polymorphismes sur l'absorption du cholestérol et les concentrations de cholestérol dans les lipoprotéines (Jakulj *et al.* 2010b).

e) SR-B1

Le rôle de SR-B1 dans l'absorption intestinale du cholestérol est peu décrit comparé à celui qu'il joue dans le transport inverse du cholestérol. Les polymorphismes du gène *SR-B1* (*SCARB1*) ont uniquement été étudiés en relation avec les niveaux de cholestérol dans les lipoprotéines (LDL et HDL), sans évaluer l'absorption du cholestérol (Acton *et al.* 1999; Morabia *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2007).

Le SNP p.Gly2Ser dans l'exon 1 est associé à des taux de HDL-cholestérol élevé et de LDL-cholestérol bas pour les porteurs de l'allèle rare (allèle 2), comparé aux homozygotes 1/1. Ce profil lipidique favorable ne se retrouve que chez les hommes dans cette étude (Acton *et al.* 1999). Perez-Martinez *et al.* ont testé l'influence de trois régimes alimentaires différents sur les concentrations plasmatiques de LDL-cholestérol en fonction du génotype de ce SNP (régimes riche en acides gras saturés *versus* riche en acides gras mono-insaturés *versus* riche en glucides). Les hétérozygotes 1/2, porteurs de la mutation, étaient plus sensibles à la présence d'acides gras saturés que les homozygotes 1/1, car en passant du régime riche en acides gras saturés au régime riche en glucides, leur concentration de LDL-cholestérol diminuait davantage (Perez-Martinez *et al.* 2003). Les mécanismes en cause ne sont pas connus. Une modulation de l'expression hépatique du LDL-R hépatique est possible.

Bien que l'absorption intestinale du cholestérol n'ait pas été étudiée en relation avec les SNPs du gène *SR-B1*, l'ensemble de ces données n'exclut pas qu'elle puisse être modulée en fonction des génotypes, ce qui pourrait expliquer en partie les variations lipoprotéiques observées dans ces études.

1.4. Statut d'absorption du cholestérol et réponse à un régime

Les bilans lipidiques chez un sujet ne permettent pas de connaître son taux d'absorption de cholestérol, or il existe une grande variabilité d'absorption inter-individuelle (29-80%) (Bosner *et al.* 1999) et de nombreux polymorphismes génétiques y contribuent. A l'heure de la biologie moléculaire et de la génétique, il est toutefois prématuré, d'un point de vue pratique et éthique, de définir le niveau d'absorption du cholestérol d'un individu en établissant sa carte génétique. Par ailleurs, un certain nombre de gènes impliqués dans le processus d'absorption du cholestérol reste à découvrir.

1.4.1 Notion de faible et fort absorbeur de cholestérol

Afin d'évaluer de manière plus qualitative, le niveau d'absorption du cholestérol chez l'homme, sont apparues les notions de faible/fort absorbeurs de cholestérol. Miettinen *et al.* ont été les premiers à introduire ce concept en subdivisant les populations étudiées en groupes d'absorbeurs en fonction des concentrations sériques du cholestanol, un marqueur d'absorption du cholestérol, rapportées à celles du cholestérol (cholestanol/cholestérol x 100). La cohorte peut être ainsi subdivisée en deux groupes selon la valeur de la médiane, mais aussi en trois (tertiles) ou quatre groupes (quartiles) si le nombre de sujets est suffisant.

Pour avoir un ordre de grandeur, la médiane est de 131.10^2 mmol de cholestanol/mol de cholestérol chez des sujets normaux ou avec une hypercholestérolémie modérée (Hallikainen *et al.* 2006). Au-dessus de cette valeur, les individus sont considérés comme forts absorbeurs et faibles synthétiseurs. A l'inverse, les individus sont faibles absorbeurs/forts synthétiseurs pour les valeurs inférieures à la médiane. L'homéostasie du cholestérol est en effet régulée par la balance synthèse/absorption (Miettinen *et al.* 1989a).

Cette distinction faible/fort absorbeur revêt un caractère essentiel dans les nouvelles stratégies thérapeutiques hypolipémiantes (Hoenig *et al.* 2006; Hiramitsu *et al.* 2010).

Remarquons que le niveau d'absorption est associé au risque cardio-vasculaire (Pinedo *et al.* 2007; Fassbender *et al.* 2008; Matthan *et al.* 2009; Cofan *et al.* 2010; Weingartner *et al.* 2010).

1.4.2 Notion de répondeur et non répondeur à un régime

Certains sujets répondent plus ou moins bien à un régime. Là encore, notre patrimoine génétique y joue un rôle notable. Afin de ne pas se limiter au processus d'absorption du cholestérol, d'autres équipes se sont intéressées à l'ensemble du métabolisme du cholestérol en mesurant les paramètres lipidiques des sujets tels que LDL-cholestérol et cholestérol total. Ces études, après un régime riche ou pauvre en cholestérol, ont permis de définir des sujets répondeurs ou non répondeurs à un régime. Cette notion est d'ailleurs plus ancienne que celle de faible/fort absorbeur. Elle a été définie comme étant « la capacité d'inhiber la synthèse du cholestérol en réponse à une augmentation de la prise alimentaire » (Ginsberg *et al.* 1994). McNamara *et al.* considèrent que 15 à 20% de la population répondraient à l'ingestion de cholestérol par de plus fortes variations des concentrations plasmatiques de lipides et seraient donc plus sensibles ou « répondeurs » au cholestérol alimentaire; 75 à 80% seraient prédisposés à de meilleurs mécanismes de régulation, dont une minorité de la population (6%) à une régulation encore plus efficace, ce qui définirait des sujets non répondeurs (McNamara 2000). Ils ont montré que de passer de 400 mg à 300 mg de cholestérol ingérés par jour pouvait induire une diminution de la cholestérolémie de 0,83 mmol/L chez des sujets répondeurs et de 0,41 mmol/L chez des sujets non répondeurs (McNamara 1997). On a également constaté que les concentrations plasmatiques de LDL- et de HDL-cholestérol chez les hyper-répondeurs augmentaient après supplémentation en cholestérol (+640mg/jour pendant 30jours) sans modification du rapport LDL/HDL et quelle que soit l'origine ethnique (Caucasienne ou Hispanique). Une augmentation des concentrations en ApoC3, Apo B et CETP expliquerait que la voie du transport inverse du cholestérol soit plus active chez les sujets hyper-répondeurs par rapport aux hypo-répondeurs (Herron *et al.* 2002).

2. Implication des stérols alimentaires dans le développement des maladies cardio-vasculaires

2.1. Cholestérol des lipoprotéines

L'athérogenèse est largement impliquée dans le développement des maladies cardio-vasculaires. Elle se traduit par la formation d'une plaque d'athérome qui occlut progressivement la lumière endothéliale et favorise la formation d'un caillot. Les lipoprotéines enrichies en cholestérol, principalement les LDL, sont en particulier responsables de ce phénomène : elles pénètrent l'endothélium vasculaire artériel et sont séquestrées dans l'intima, où elles sont soumises à des réactions d'oxydation, de glycosylation et d'hydrolyse de molécules de surface. Ces particules modifiées sont phagocytées par des macrophages qui vont évoluer en cellules spumeuses et contribuer à l'élaboration de la strie lipidique, assise de la plaque athéromateuse.

Il est depuis longtemps reconnu que le LDL-cholestérol joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. Il est cependant plus délicat de mesurer la part de cholestérol alimentaire qui y contribue (Huff 2003). La plupart des études établissent une relation positive entre la quantité de cholestérol ingérée et le taux de LDL-cholestérol (Sehayek *et al.* 1998a), sans pour autant que cette relation soit associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire (McNamara 2000).

Le métabolisme des LDL est toutefois intimement lié au métabolisme des lipides contenus dans les autres classes de lipoprotéines. Les VLDL et les chylomicrons participent également à la formation de cellules spumeuses et peuvent être captés par des cellules musculaires lisses et des fibroblastes qui migrent et qui prolifèrent au niveau de l'endothélium lésé (Huff 2003). Brown *et al.* ont montré que les résidus de chylomicrons pouvaient être captés par les macrophages grâce à un récepteur spécifique aux apo-B48, leur conférant ainsi un pouvoir athérogène (Brown *et al.* 2000).

A l'opposé, le rôle athéroprotecteur des HDL a largement été décrit: les concentrations plasmatiques de HDL cholestérol sont inversement associées à la prévalence des maladies cardio-vasculaires (Assmann *et al.* 2003).

L'effet protecteur des HDL est en partie attribué à leur rôle dans le transport inverse du cholestérol médié par la CETP, dont l'activité augmente en période postprandiale. D'autres mécanismes participent à cet effet bénéfique : les concentrations plasmatiques de HDL sont associées à l'activation de la NO synthase, à la biodisponibilité du NO au niveau de l'endothélium, ainsi qu'à une diminution de l'expression des molécules responsables du recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium lésé (O'Connell *et al.* 2001). Des propriétés anti-oxydantes vis à vis des LDL ont aussi été décrites (Navab *et al.* 2000). Les HDL possèdent en effet des molécules lipophiles anti-oxydantes (alpha-tocophérol, résidus méthionine sulfoxydes de l'Apo AI, paraoxanase (Durrington *et al.* 2001)...).

2.2. Oxystérols

Les oxystérols peuvent être d'origine endogène ou exogène. Les aliments riches en cholestérol, tels que la viande, les œufs et les produits laitiers, contiennent des oxystérols en quantité non négligeable. Ces oxystérols sont principalement générés par la cuisson ou pendant le stockage des denrées (Brown *et al.* 2009). Un régime de type occidental est donc susceptible de contribuer à un apport excessif de lipides oxydés.

Bien que l'étiologie de l'athérosclérose soit multifactorielle, on accorde un rôle important aux lipoprotéines oxydées dans l'athérogenèse. Les oxystérols alimentaires, tout comme les acides gras oxydés, ont alors été incriminés dans le développement des MCV en contribuant au pool des lipides des lipoprotéines oxydées (Staprans *et al.* 2005). Plusieurs études chez l'homme et chez l'animal ont montré que les lipides oxydés ingérés étaient absorbés par l'entérocyte et se retrouvaient dans les chylomicrons sécrétés en période postprandiale et dans les résidus de chylomicrons (Brown *et al.* 1999a). Mais alors que les acides gras oxydés se retrouvent

exclusivement dans ces TRL sur une durée de 8 heures, les alpha-epoxy cholestérol sont localisés dans les autres types de lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) et restent en circulation pendant 72 heures, probablement par transfert des oxycholestérols des chylomicrons vers les LDL et HDL, via la CETP (Staprans *et al.* 2005). Les études chez l'animal sont cependant controversées. Alors que certains auteurs observent une augmentation des stries lipidiques et des lésions aortiques (Staprans *et al.* 2005), d'autres équipes ont démontré que les oxyphytostérols absorbés (Tomoyori *et al.* 2004) et que les oxycholestérols alimentaires (Ando *et al.* 2002) n'accéléraient pas le processus athéromateux. Les contributions qualitative et quantitative des oxystérols dans l'athérogenèse restent donc à être évaluées chez l'homme (Brown *et al.* 2009).

2.3. Phytostérols

Les phytostérols et phytostanols peuvent être intégrés à notre alimentation quotidienne sous forme de produits enrichis. Leur effet hypocholestérolémiant a été démontré : aux doses de 2g/j, la concentration de LDL-cholestérol diminue d'environ 10% (Ostlund 2002). L'intérêt croissant porté aux régimes alimentaires et l'apparition de toute une gamme de produits dits « fonctionnels » ont engendré des consommations excessives qui ont alerté certains scientifiques quant à leur parfaite innocuité. En effet, avant l'introduction et la commercialisation de ces produits « diététiques », seuls les végétariens stricts consommaient de grandes quantités de végétaux permettant d'atteindre 1g de stérols végétaux, dose à partir de laquelle les effets bénéfiques sont observés.

Parallèlement, les phytostérols plasmatiques se trouvent anormalement augmentés (50 à 60 fois supérieurs à la normale) dans les cas de sitostérolémie, qui se manifeste par une athérosclérose coronarienne précoce et sévère s'accompagnant d'une xanthomatose tendineuse (Berge *et al.* 2000). Aussi, chez ces patients, la cholestérolémie est variable (Lutjohann *et al.* 1995), souvent élevée en début de maladie, elle dépasse à peine les valeurs physiologiques par la suite (Salen *et al.* 1992).

Certains auteurs se sont alors demandés si une consommation accrue de phytostérols et plus particulièrement sous forme de compléments alimentaires, n'était pas sans risque vasculaire (Sudhop *et al.* 2002a; Patel *et al.* 2006). Des corrélations positives ont été trouvées entre les concentrations plasmatiques de phytostérols et le risque cardio-vasculaire (Assmann *et al.* 2006). L'augmentation de l'absorption des stérols serait aussi associée à des concentrations de phytostérols élevées, à la fois dans le sérum et dans les plaques d'athérome (Miettinen *et al.* 2005). Le risque cardio-vasculaire serait-il alors plus important chez des sujets hyperabsorbeurs de phytostérols et de cholestérol (Miettinen *et al.* 2006)?

Houweling *et al.* ont mesuré les variations plasmatiques du campestérol et du sitostérol après quatre semaines de supplémentation en phytostérols (2g/j) chez des sujets faibles ou forts absorbeurs de phytostérols. Quel que soit le niveau d'absorption des sujets, les concentrations plasmatiques de phytostérols augmentent avec la même amplitude et de façon très modérée, de sorte qu'elles restent bien en deçà des valeurs rencontrées chez des sujets atteints de sitostérolémie (Houweling *et al.* 2009).

Un grand nombre d'études sont en faveur des phytostérols et démontrent largement leur rôle athéroprotecteur grâce à la diminution des concentrations de LDL-cholestérol (Chan *et al.* 2006; Pinedo *et al.* 2007; Marangoni *et al.* 2010). Aucun effet indésirable lié à la consommation de phytostérols n'a été observé dans ces études.

3. Modulateurs pharmacologiques de l'absorption du cholestérol

L'implication des LDL dans l'athérogenèse n'est aujourd'hui plus contestée : des essais cliniques menés chez des sujets hypercholestérolémiques ont permis de montrer que la diminution des concentrations plasmatiques de LDL-cholestérol pouvait réduire l'incidence des maladies cardio-vasculaires (Steinberg *et al.* 1999). Ces observations ont incité la communauté scientifique à recommander une échelle de valeurs des taux circulants de LDL-cholestérol à atteindre en fonction de l'échelle de risque de MCV (NCEP 2002; Grundy *et al.* 2004). Le

cholestérol d'origine intestinale étant apporté dans la circulation par les chylomicrons, ces particules reçoivent un intérêt grandissant puisqu'elles s'accumulent en période postprandiale. Différents traitements, en monothérapie ou en association, peuvent être envisagés pour remplir ces objectifs.

3.1. Les traitements actuels

3.1.1 Les statines

Les statines sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, une enzyme essentielle de la synthèse du cholestérol (Figure7). Leur effet sur l'absorption n'est pas clairement défini. La déplétion en cholestérol intracellulaire induite par les statines serait indirectement compensée par une augmentation de l'absorption du cholestérol, via une diminution de la sécrétion biliaire des stérols (Miettinen *et al.* 2003).

3.1.2 Les fibrates

Les fibrates sont des agonistes des facteurs de transcription PPAR α . Ils diminuent modestement l'absorption du cholestérol en augmentant son excrétion biliaire (McNamara *et al.* 1980).

3.1.3 Les séquestrants biliaires

L'action localisée des séquestrants biliaires (cholestyramine, colesevelam...) dans la lumière intestinale cible davantage le processus d'absorption du cholestérol. En complexant les sels biliaires de manière irréversible, et à un degré moindre le cholestérol, ils entraînent leur excrétion fécale et obligent les hépatocytes à synthétiser davantage de sels biliaires à partir du cholestérol. La diminution consécutive du cholestérol intracellulaire stimule l'expression des LDL-receptors, ce qui se traduit par une augmentation de la captation des LDL et donc une baisse des concentrations plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol (Hou *et al.* 2009).

3.1.4 L'Ezetimibe

L'Ezetimibe est un hypolipémiant récent qui agit spécifiquement sur l'absorption du cholestérol en inhibant le transporteur NPC1L1 situé dans la bordure en brosse des entérocytes (Garcia-Calvo *et al.* 2005). La quantité de cholestérol délivrée au foie par les lipoprotéines intestinales (chylomicrons) diminue en conséquence et provoque la surexpression du LDL-R, ce qui induit finalement une augmentation de la clairance du cholestérol plasmatique et une baisse de la cholestérolémie. L'Ezetimibe pourrait aussi bloquer l'endocytose du cholestérol micellaire en se liant à l'aminopeptidase N (CD13) présente dans la bordure en brosse des entérocytes (Levy *et al.* 2007). D'autres auteurs ont également suggéré que l'Ezetimibe pouvait se lier à SR-B1 et au CD36 (Hui *et al.* 2008).

En monothérapie, l'Ezetimibe réduit le cholestérol plasmatique total de 13,5%, le LDL-cholestérol de 18,6% et les triglycérides plasmatiques de 8,1% ; il augmente le HDL-cholestérol de 3,0% (Pandor *et al.* 2009). L'effet hypolipémiant est supérieur en bi-thérapie avec une statine (Mikhailidis *et al.* 2007).

Alors que les statines sont encore largement utilisées, la mise sur le marché de l'Ezetimibe a permis d'optimiser le traitement hypolipémiant en fonction de la sensibilité du sujet aux statines. En effet, chez certains patients traités par statines, la diminution du LDL-cholestérol ne s'accompagne pas d'un moindre risque de MCV. Chez d'autres, le niveau de LDL-cholestérol souhaité ne peut être atteint en monothérapie (Daskalopoulou *et al.* 2006). La sensibilité au traitement est en partie attribuable au niveau d'absorption et de synthèse des sujets, comme l'a montré l'équipe de Miettinen dans l'étude des 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) (Miettinen *et al.* 2000b). Les statines sont en effet moins efficaces chez des sujets faibles synthétiseurs/forts absorbeurs, la meilleure alternative thérapeutique étant de combiner deux types d'hypolipémiants, l'un agissant sur la synthèse (statines), l'autre sur l'absorption (Ezetimibe). Chez 591 patients présentant une hypercholestérolémie familiale et traités en bi-thérapie simvastatine/Ezetimibe pendant deux ans, l'inhibition de l'absorption était

effectivement plus importante chez les forts absorbeurs. Il n'y avait cependant pas de différences significatives en terme de diminution du LDL-cholestérol entre faibles et forts absorbeurs (Jakulj *et al.* 2010a). Compte tenu de la composante héréditaire liée à cette pathologie, il paraît plus avisé de ne pas remettre en cause trop hâtivement la notion de faible/fort absorbeur de cholestérol dans l'optimisation des traitements hypolipémiants.

3.1.5 Les phytostérols et phytostanols

Les stérols végétaux ont un effet hypocholestérolémiant connu depuis près d'un demi-siècle, mais les mécanismes impliqués sont toujours activement étudiés.

Deux types de mécanismes seraient impliqués, l'un luminal, l'autre intra-entérocytaire (Calpe-Berdiel *et al.* 2009) :

- Dans la lumière intestinale, les phytostérols seraient en compétition avec le cholestérol libre lors de leur incorporation dans les micelles mixtes, une étape indispensable à l'absorption des stérols au contact de la couche d'eau non agitée et de la bordure en brosse des cellules intestinales. Leur plus grande hydrophobicité potentialiserait leur affinité pour les micelles (Ikeda *et al.* 1989).
- Par ailleurs, les phytostérols auraient des cibles moléculaires potentielles :
 - En diminuant l'expression du gène *NPC1L1*, ils réduiraient la captation entérocytaire du cholestérol (Duval *et al.* 2006).
 - En diminuant le taux d'estérification du cholestérol par l'ACAT-2, la quantité de cholestérol sécrétée par les chylomicrons pourrait être diminuée (Temel *et al.* 2003).
 - En stimulant l'expression des transporteurs ABCG5/G8 (Duan *et al.* 2004) et ABCA1, l'efflux apical ou basolatéral de cholestérol serait activé, ce qui augmenterait l'excrétion de cholestérol dans les fèces. Ce mécanisme d'action serait toutefois remis en question (Calpe-Berdiel *et al.* 2009).

En agissant sur les mécanismes d'entrée et de sortie du cholestérol, les phytostérols à la dose d'environ 2g/j peuvent diminuer le niveau de cholestérol LDL de l'organisme de 10 à 14 %

(Miettinen *et al.* 1995; Ostlund 2002). Dès 1957, Eli Lilly introduit les phytostérols et plus particulièrement le β -sitostérol comme nouvel agent thérapeutique hypocholestérolémiant. Il faudra cependant attendre les avancements technologique et galénique des deux dernières décennies pour voir apparaître des aliments dits « fonctionnels », telles que des margarines (Pro-Activ®), des yaourts ou boissons (Danacol®)... enrichis en phytostérols. C'est véritablement depuis 1995 que l'étude publiée dans le "New England Journal of Medicine" a focalisé l'attention des cliniciens sur ces produits (Miettinen *et al.* 1995).

3.2. Les traitements d'avenir

3.2.1 Les inhibiteurs de la MTP

L'inhibition de la MTP permet de diminuer la sécrétion des chylomicrons et donc le passage des lipides, dont le cholestérol, à travers la barrière intestinale. Les inhibiteurs, s'ils ne ciblent pas uniquement l'intestin, provoquent l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, ce qui constitue un obstacle au développement d'inhibiteur de la MTP (Chandler *et al.* 2003). Des essais chez le porc sont cependant encourageants quant à la spécificité d'action au niveau des entérocytes (Aggarwal *et al.* 2005). L'augmentation du cholestérol libre intracellulaire pourrait également être à l'origine d'autres effets indésirables, puisque la MTP joue aussi un rôle dans l'estérification du cholestérol (Iqbal *et al.* 2008b). Afin d'éviter la potentielle toxicité du cholestérol libre, l'inhibiteur de la MTP pourrait être associé à un inhibiteur de synthèse du cholestérol (Statines ou inhibiteurs de la squalène synthase) ou encore à un agoniste des LXRs, qui augmenterait l'efflux du cholestérol libre via les transporteurs ABCA1 ou ABCG5/G8 (Hussain *et al.* 2008). Les inhibiteurs de squalène synthase et les agonistes de LXRs étudiés en vue de diminuer l'absorption du cholestérol sont toujours en phase de développement clinique.

3.2.2 Les inhibiteurs de l'ACAT

Les inhibiteurs d'ACAT-1 préviendraient la formation des plaques d'athérome en diminuant la

formation de cellules spumeuses dans la paroi vasculaire, alors que les inhibiteurs d'ACAT-2 conduiraient à une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol (Rudel *et al.* 2005). L'avenir des inhibiteurs d'ACAT repose sur l'identification de principes actifs spécifiques de chaque forme de l'enzyme. On pourrait également envisager d'utiliser des inhibiteurs partiels afin de limiter les effets délétères, liés à l'inhibition totale de l'ACAT-1 (Accad *et al.* 2000).

3.2.3 Les inhibiteurs d'IBAT

Le transporteur IBAT (ileal sodium-dependent bile acid transporter), localisé dans la bordure en brosse des entérocytes, permet de réabsorber les acides biliaries dans l'iléon. Il constitue une cible intéressante, car son inhibition augmenterait l'élimination des acides biliaries dans les fèces et activerait la transformation du cholestérol en ces composés. Différents inhibiteurs d'IBAT induisent une hypocholestérolémie chez l'animal (Ichihashi *et al.* 1998; Sakamoto *et al.* 2007), mais aucun n'a encore été testé chez l'homme. L'augmentation de la concentration d'acides biliaries libres dans la lumière intestinale pourrait être à l'origine d'effets indésirables, telles que des diarrhées ou des maladies intestinales plus graves (cancer du côlon) (Izzat *et al.* 2000).

4. Moyens d'étude de la variabilité d'absorption du cholestérol

Un certain nombre de méthodes ont été développées dans le but de quantifier l'absorption intestinale du cholestérol (Matthan *et al.* 2004). On distingue les méthodes, plus anciennes, qui utilisent des isotopes radioactifs, de celles qui n'en font pas l'usage. Les approches analytiques nécessitant l'administration d'isotopes radioactifs ne sont presque plus utilisées chez l'homme depuis une trentaine d'années, alors qu'elles continuent à l'être chez l'animal. On compte parmi elles, la méthode de la balance des stérols (Grundy *et al.* 1969; Quintao *et al.* 1971), la méthode de collecte des fèces ou « fecal dual isotope ratio method (Borgstrom 1969) », la méthode de Zilversmit ou « dual isotope plasma ratio method » (Zilversmit 1972) et la perfusion intestinale

(Grundy *et al.* 1977), la seule méthode qui fournisse une estimation directe de l'absorption nette de cholestérol. D'autres approches analytiques, plus sûres et mieux adaptées aux études chez l'homme, consistent soit à administrer des isotopes stables et à mesurer leurs concentrations plasmatiques (Bosner *et al.* 1999), soit à quantifier des marqueurs d'absorption et de synthèse du cholestérol naturellement présent à l'état de traces dans le plasma (Tilvis *et al.* 1986; Miettinen *et al.* 1990).

Pour faciliter la compréhension du manuscrit, on parlera de méthode « directe » quand il s'agit de l'administration simultanée de deux isotopes stables, alors que la méthode « indirecte » désignera celle mesurant les marqueurs « indirects » de l'absorption et de la synthèse du cholestérol.

4.1. Méthode indirecte : marqueurs d'absorption et de synthèse

Parallèlement aux techniques employant des isotopes radioactifs puis stables, Miettinen *et al.* ont développé une méthode de dosage permettant d'étudier l'absorption du cholestérol sans administration préalable de molécules exogènes marquées (Tilvis *et al.* 1986; Miettinen *et al.* 1989b; Miettinen *et al.* 1990). Cette méthode indirecte non invasive peut être envisagée sur de vastes populations (Miettinen *et al.* 2000b; Fassbender *et al.* 2008) et être appliquée à diverses études cliniques, par exemple :

- des études cinétiques, qui associent la lipémie postprandiale aux niveaux de synthèse et d'absorption (Agren *et al.* 2006; Hallikainen *et al.* 2006),
- des études cas/contrôles, pour mieux comprendre l'homéostasie du cholestérol dans différentes situations physio-pathologiques (Simonen *et al.* 2000; Miettinen *et al.* 2004; Pinedo *et al.* 2007; Simonen *et al.* 2007),
- des études d'interventions nutritionnelles, pour expliquer les relations entre lipides alimentaires et absorption du cholestérol (Sehayek *et al.* 1998a; Nissinen *et al.* 2008b; Houweling *et al.* 2009), ou d'interventions thérapeutiques (Miettinen *et al.* 2003; Hiramitsu *et al.* 2010).

A partir d'un simple prélèvement de sang, les concentrations plasmatiques de plusieurs molécules, continuellement présentes à l'état de traces chez l'homme, sont déterminées par des méthodes chromatographiques. Une étude critique de ces techniques a été présentée sous forme de revue par Kuksis en 2001 (Kuksis 2001). Ces molécules sont des précurseurs de synthèse du cholestérol (lathostérol, desmostérol) ou un métabolite de synthèse (cholestanol), et des phytostérols (campestérol et sitostérol) (Figure 8).

Les concentrations sériques de ces molécules sont des indicateurs ou des « marqueurs indirects » du métabolisme du cholestérol chez l'homme : leurs variations sont pour certains caractéristiques de l'absorption du cholestérol (cholestanol, sitostérol, campestérol), alors que d'autres reflètent la synthèse du cholestérol (desmostérol, lathostérol). Les valeurs sériques obtenues sont généralement rapportées à la concentration de cholestérol, mesurée au cours d'une même analyse, afin de s'affranchir des variations inter- et intra-individuelles du taux de cholestérol.

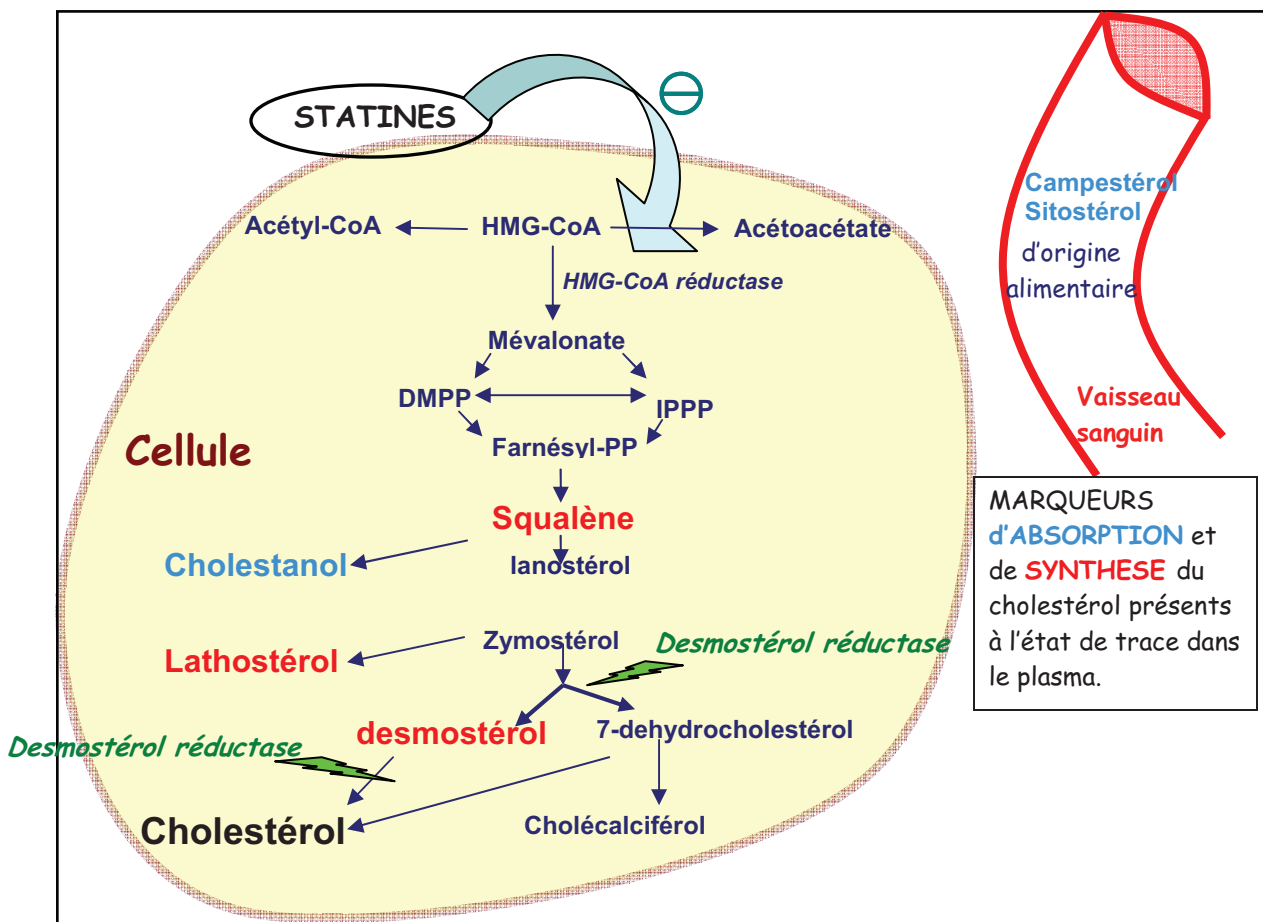


Figure 8: Etapes de synthèse du cholestérol dans une cellule eucaryote. Origine des marqueurs de synthèse et d'absorption du cholestérol utilisés dans l'étude du métabolisme du cholestérol.

4.1.1 Marqueurs d'absorption

a) Les phytostérols

Analogues végétaux du cholestérol (Figure 9), les phytostérols sont synthétisés par les plantes et proviennent donc essentiellement de notre alimentation. Comme indiqué plus avant, l'absorption des phytostérols est régulée par les mêmes transporteurs que le cholestérol (NPC1L1 et ABCG5/G8), mais ils sont beaucoup moins bien absorbés que le cholestérol exogène avec lequel ils rentrent en compétition. Leur absorption est cependant proportionnelle à celle du cholestérol et donc propre à chaque individu selon son statut faible ou fort absorbeur (Tilvis *et al.* 1986). Les concentrations de phytostérols sont en effet variables d'un individu à l'autre, mais stables dans le temps pour un individu donné (Berge *et al.* 2002; Plat *et al.* 2005a).

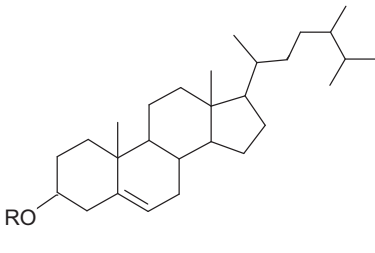
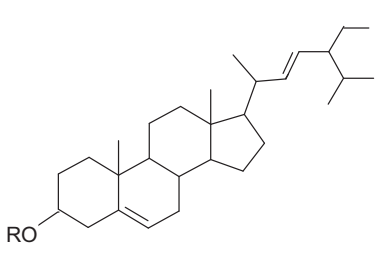
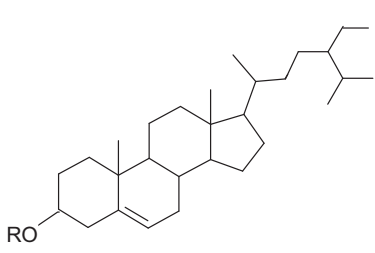
CAMPESTEROL	STIGMASTEROL	SITOSTEROL
M=400 g/mol	M=412 g/mol	M=414 g/mol
		

Figure 9 : Formules développées et masses moléculaires des principaux phytostérols (R=H).

b) Le cholestanol

Le cholestanol (Figure 10) est un métabolite du cholestérol. Il diffère de ce dernier par l'absence d'une double liaison dans le cycle B. Très peu présent dans les aliments, il est le marqueur d'absorption du cholestérol le plus fiable (Miettinen *et al.* 1989b), puisqu'il n'est pas influencé par les apports alimentaires, contrairement aux phytostérols (campesterol et le sitostérol) (Ostlund *et al.* 2002b; Nissinen *et al.* 2008b). Ce marqueur est également utilisé comme indicateur de la fréquence des événements coronaires (Miettinen *et al.* 1998; Matthan *et al.* 2009).

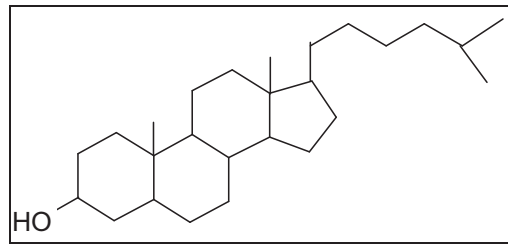


Figure 10: Formule développée du cholestanol (M=388 g/mol).

4.1.2 Marqueurs de synthèse

Les précurseurs du cholestérol peuvent être considérés comme des indicateurs du niveau de biosynthèse du cholestérol chez l'homme. Les plus couramment utilisés sont les suivants :

a) Le lathostérol

C'est un précurseur direct (Figure 11) du cholestérol, ce qui fait de lui un très bon indicateur de synthèse du cholestérol contrairement au lanostérol et autres méthyl stérols (Kempen *et al.* 1988).

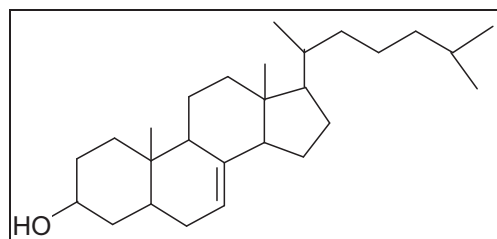


Figure 11: Formule développée du lathostérol (M =386 g/mol).

b) Le desmostérol

C'est également un précurseur direct (Figure 12), converti en cholestérol après action de la desmostérol réductase (Figure 8).

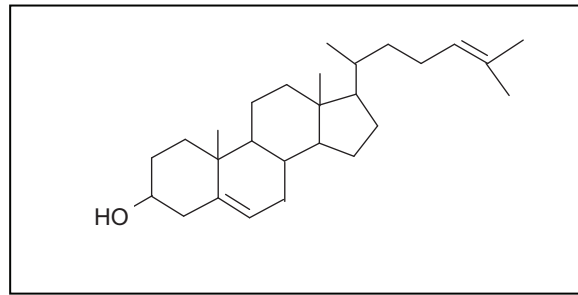


Figure 12: Formule développée du desmostérol (M =384 g/mol).

La desmostérol réductase peut aussi réduire la double liaison sur la chaîne latérale du zymostérol, conduisant alors au lathostérol.

4.1.3 Intérêts de la méthode indirecte

Peu onéreuse, non invasive, la méthode indirecte nécessite un simple prélèvement sanguin à partir duquel les concentrations des marqueurs sont déterminées. Elle peut donc s'appliquer à de grandes cohortes. En outre, les concentrations plasmatiques de cholestérol ne permettant pas d'interpréter la tendance à l'absorption ou à la synthèse du cholestérol d'un individu, calculer le rapport de concentrations plasmatiques entre phytostérols et cholestérol permet de déterminer des sujets forts ou faibles absorbeurs : un rapport élevé indique une forte absorption du cholestérol, tandis qu'un rapport bas signifie que l'absorption est relativement faible (Miettinen *et al.* 1990).

4.1.4 Limites de la méthode indirecte

La difficulté de la mise au point de la méthode de dosage indirecte peut être dissuasive, car les concentrations des marqueurs sont extrêmement faibles surtout en regard du cholestérol plasmatique 500 à 20 000 fois plus concentré (von Bergmann *et al.* 2005). La séparation et la quantification des différents composés nécessitent un appareillage extrêmement sensible et il est préférable de les doser en chromatographie gazeuse (Kuksis 2001). Le cholestanol notamment, possède une structure très proche de celle du cholestérol et la séparation des deux composés requiert une mise au point analytique complexe (Phillips *et al.* 1999; Ahmida *et al.* 2006).

Il n'existe d'ailleurs pas de consensus quant à l'application de la méthode indirecte. Les variations méthodologiques entre les laboratoires peuvent être importantes ou peu précisées (Phillips *et al.* 1999). Les échelles de valeurs des marqueurs indirects sont assez larges et relativement variables d'une équipe à l'autre (Miettinen *et al.* 1989b; Kempen *et al.* 1991; Ahmida *et al.* 2006; Pinedo *et al.* 2007; Escuriol *et al.* 2009). Les unités dans laquelle les marqueurs sont exprimés ne sont pas aisément comparables (Miettinen *et al.* 1990; Kempen *et al.* 1991; von Bergmann *et al.* 2005).

Par ailleurs, cette méthode est tributaire du régime alimentaire des sujets, en particulier de sa composition en phytostérols. Il est recommandé d'utiliser ces marqueurs indirects dans des conditions d'équilibre nutritionnel, c'est-à-dire, sans qu'il n'y ait de variations importantes des apports en phytostérols (Vanstone *et al.* 2004; Nissinen *et al.* 2008b). Il est toutefois possible d'y remédier en utilisant le rapport de concentrations lathostérol/cholestanol qui est un bon indicateur du métabolisme du cholestérol. Des polymorphismes génétiques affectant le métabolisme des lipides et l'absorption des phytostérols peuvent également conduire à de mauvaises interprétations, telles que les formes hétérozygotes de sitostérolémie (mutations du gène *ABCG5* ou *ABCG8*) qui s'expriment par une modeste élévation des concentrations de phytostérols (Salen *et al.* 1992).

4.2. Méthode directe : les isotopes stables

La méthode directe est une approche analytique beaucoup plus précise que la méthode indirecte, dans le sens où elle quantifie l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire par la mesure d'un coefficient d'absorption, alors que les marqueurs indirects sont le reflet de l'absorption ou de la synthèse du cholestérol.

4.2.1 Les isotopes stables et radioactifs

Afin d'étudier le devenir d'un nutriment ou d'un substrat dans l'organisme, celui-ci peut être

marqué par un isotope, dont on mesure les concentrations dans les différents compartiments corporels. L'utilisation d'isotopes radioactifs chez l'homme n'est plus autorisée pour la recherche en France et dans de nombreux pays, c'est pourquoi des méthodes employant des isotopes stables ont été développées (^{13}C , ^2H ou ^{18}O) (Beylot 1994; Gremaud *et al.* 2001; Pouteau *et al.* 2003).

Par définition, un isotope désigne un ensemble d'éléments chimiques qui se différencient par leur nombre de neutrons (ou masse atomique), mais qui possèdent le même nombre de protons (ou numéro atomique).

On parle d'isotope « stable » lorsque l'énergie de liaison des nucléons (protons+neutrons) est élevée : le noyau atomique reste donc stable au cours du temps et ne donne aucun produit de désintégration. En d'autres termes, il n'émet aucun rayonnement radioactif (α , β , γ ...) au même titre que l'atome d'hydrogène présent dans notre environnement. Le deutérium est un élément présent à l'état naturel, on le trouve à raison de 0,015 % par rapport à l'hydrogène, ce qui représente environ 1g de deutérium chez un homme de 70 kg ou 16 g sous forme D_2O (eau lourde) dans 1 m^3 d'eau de mer.

Inversement, quand l'énergie de liaison est faible, le noyau est instable et se transforme spontanément en d'autres noyaux par émission de rayonnement ou de particule : il s'agit de la radioactivité.

De nombreuses méthodes d'analyses ont été développées afin de quantifier l'absorption du cholestérol en suivant son devenir métabolique à l'aide de molécules enrichies en isotopes stables (Bosner *et al.* 1993; Lutjohann *et al.* 1993; Wang *et al.* 2004c).

Le traceur utilisé est généralement la molécule de cholestérol enrichie par plusieurs ^{13}C ou ^2H de sorte à augmenter significativement sa masse par rapport à celle du cholestérol naturel puisqu'elle se trouve diluée dans le plasma (Figure 13).

La mesure de l'apparition d'un seul traceur ingéré dans le plasma ne permet pas d'évaluer le taux d'absorption du cholestérol exogène, mais peut suffire à comparer des niveaux d'absorption chez

le même sujet dans des conditions contrastées (Wang *et al.* 2004c). Un double marquage isotopique, impliquant le calcul d'un rapport de concentrations, est nécessaire et plusieurs protocoles ont été proposés dans la littérature:

- soit les sujets volontaires ingèrent simultanément pendant une semaine, deux traceurs (du cholestérol et du sitostanol marqués). Le sitostanol n'étant pas absorbé, la mesure du rapport de concentrations dans les fèces donne le pourcentage de cholestérol marqué absorbé (Lutjohann *et al.* 1993) ;
- soit on mesure le rapport de concentrations sériques de deux marqueurs du cholestérol administrés simultanément, l'un par voie orale, l'autre par voie IV (Bosner *et al.* 1993; Bosner *et al.* 1999). Cette méthode de dosage est inspirée de la technique de Zilversmit (Zilversmit 1972), qui utilisait des marqueurs radioactifs chez l'animal. La mesure se fait à l'équilibre isotopique, c'est-à-dire 72 heures après l'administration des deux traceurs. D'autres travaux montrent toutefois que l'état d'équilibre du traceur heptadeutééré exogène est atteint à partir de 24 heures (Beaumier-Gallon *et al.* 1998a; Beaumier-Gallon *et al.* 2001).

Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont comparables et permettent d'établir le taux d'absorption du cholestérol moyen avec précision ($47 \pm 12 \%$ (Lutjohann *et al.* 1993) ou $54 \pm 8\%$ (Bosner *et al.* 1999)).

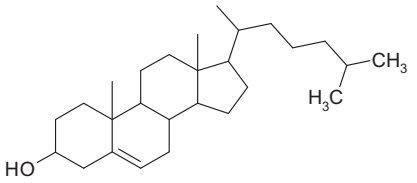
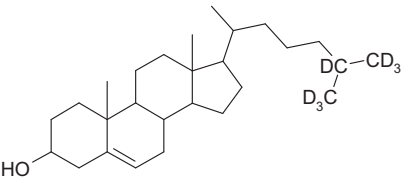
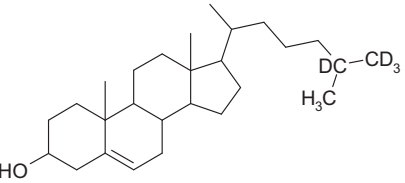
Cholestérol	Cholestérol heptadeutééré	Cholestérol tétradeutééré
		
MM=386 g/mol	M=393 g/mol	M=389 g/mol

Figure 13 : Formules moléculaires du cholestérol (C₂₇H₄₆O) et de deux isotopes du cholestérol, le D7-cholestérol (C₂₇H₃₉ D₇O) et le D4-cholestérol (C₂₇H₃₅ D₄O).

4.2.2 Intérêts de la méthode directe

Chez l'homme, les isotopes stables présentent plusieurs avantages en regard des isotopes radioactifs:

- leur utilisation ne présente pas de risques radiotoxiques à court ou à long terme, ni d'effets indésirables aux doses administrées (Jones *et al.* 1991);
- ils peuvent marquer un ou plusieurs atomes d'une même molécule. On peut également utiliser plusieurs molécules avec des marquages différents pour suivre ces traceurs sur plusieurs voies métaboliques ou pour comparer diverses voies d'administration ;
- le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse permet une détection sensible, sélective et simultanée du traceur et de la molécule naturelle ;
- les échantillons contenant le traceur peuvent être stockés et réanalysés, car ils sont stables dans le temps, contrairement à leurs analogues radioactifs qui subissent une décroissance radioactive.

4.2.3 Limites de la méthode directe

La principale limite de cette méthode est d'ordre pécuniaire. Les molécules enrichies en isotopes stables ont un coût très élevé et l'appareillage requis pour le dosage de ces molécules représente également un investissement important.

Par ailleurs, l'injection intraveineuse d'un des deux traceurs nécessite l'obtention d'une forme galénique répondant à des critères réglementaires. Soulignons au passage les difficultés récurrentes, bien qu'injustifiées, rencontrées en France pour l'obtention d'avis favorables pour ce type de protocole par les Comités d'éthique (CPP).

La quantification de ces traceurs nécessitent aussi la mise au point d'une méthode d'analyse souvent complexe, par opposition aux éléments radioactifs, plus faciles à détecter avec des doses plus faibles et un temps d'analyse inférieur. Par exemple, le dosage du cholestérol marqué par un isotope stable est à la fois influencé par l'existence d'isotopomères du cholestérol naturel et par un effet « matrice », constaté par la différence de signal du marqueur observée en solution pure

ou en présence de cholestérol (plasmatique ou en solution), cette différence n'étant pas proportionnelle à la concentration de cholestérol marqué.

L'interférence liée aux isotopomères du cholestérol s'explique par la présence naturelle des isotopes du carbone (^{13}C , ^{14}C), de l'hydrogène (^2H , ^3H) et de l'oxygène (^{17}O , ^{18}O). On considère cet amas isotopique comme étant du cholestérol (en tant que composé organique). Leurs abondances relatives sont calculées à l'aide d'un logiciel, qui se base sur la formule moléculaire du composé.

La présence d'isotopomères n'est pas à négliger en dépit de leur faible abondance, car les traceurs sont eux aussi en très faible quantité dans le plasma comparés au cholestérol. Il en résulte des interférences analytiques, qui viennent perturber le dosage du cholestérol marqué et qui nécessitent la détermination préalable de facteurs de correction (cf article n°3).

TRAVAUX PERSONNELS

OBJECTIFS

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque essentiel dans le développement des MCV et la diminution des concentrations de LDL-cholestérol demeure un objectif clinique et de santé publique pour réduire l'incidence de ces pathologies (NCEP 2002). L'homéostasie du cholestérol met en œuvre des mécanismes de régulations complexes qui impliquent à la fois l'absorption et la synthèse du cholestérol. Bien que notre objectif principal soit d'étudier la variabilité d'absorption du cholestérol chez l'homme, l'étude simultanée de ces deux paramètres par la méthode de dosage « indirecte » permet de considérer le métabolisme du cholestérol dans sa globalité.

Notre premier objectif a été d'utiliser la méthode de dosage « indirecte » chez des individus présentant un risque cardio-vasculaire modéré (*Article n°1*) et de déterminer si le régime alimentaire (type occidental *versus* type méditerranéen) peut moduler les niveaux d'absorption et de synthèse du cholestérol des sujets. On a également testé la réponse en terme de cholestérol circulant, à un régime occidental ou un régime de type méditerranéen, selon le statut faible ou fort absorbeur de cholestérol des volontaires.

Dans le but d'explicitier la grande variabilité inter-individuelle d'absorption du cholestérol, nous nous sommes intéressés en sus des facteurs nutritionnels, aux facteurs génétiques. Notre deuxième objectif a été de tester les interactions gènes-régime en se basant dans un premier temps sur un polymorphisme génétique du gène de la MTP, une protéine essentielle dans l'assemblage des lipoprotéines intestinales (*Article n°2*).

Enfin, le développement et la mise au point d'une méthode de dosage « directe » a constitué notre troisième objectif afin d'optimiser notre étude de l'absorption du cholestérol. Le dosage simultané de deux isotopes stables du cholestérol (*Article n°3*) est nécessaire dans la méthode « directe ». De plus, il serait particulièrement intéressant de pouvoir mesurer simultanément les

concentrations plasmatiques des marqueurs directs et indirects au cours d'une seule et même analyse en vue de l'application systématique de la méthode indirecte dans différentes études chez l'homme.

ARTICLES

INTRODUCTION A L'ARTICLE N°1

Les habitudes alimentaires jouent un rôle important dans le développement des maladies cardio-vasculaires. En particulier, les régimes riches en graisses saturées et/ou en cholestérol sont reconnus pour augmenter les taux plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol, paramètres largement utilisés en pratique clinique comme marqueurs de risque. Cette diminution des concentrations de LDL-cholestérol peut être obtenue par un régime pauvre en cholestérol et en matières grasses, de type méditerranéen. Le but de ce travail a été d'évaluer les effets d'un tel régime sur le statut d'absorption du cholestérol des sujets, défini avant intervention sous un régime de type occidental, chez des sujets présentant un risque cardio-vasculaire modéré. On a émis l'hypothèse que les sujets forts absorbeurs pourraient mieux répondre à une diminution de l'apport en lipides et en cholestérol. Nous avons alors vérifié si des relations existaient entre le statut d'absorbeur et la réponse à un régime occidental ou de type méditerranéen. Pour cela, nous avons comparé les valeurs des paramètres lipidiques des sujets en fonction de leur statut avant intervention sous un régime occidental (T0), puis après 3 mois de régime de type méditerranéen (T3).

Afin de déterminer les niveaux d'absorption et de synthèse du cholestérol des individus, les marqueurs d'absorption (cholestanol, sitostérol et campestérol) et de synthèse (lathosterol et desmostérol) du cholestérol ont été analysés à T0 et à T3, chez 125 hommes et femmes (28-70 ans), recrutés dans l'étude MEDI-Rivage. La cohorte a été subdivisée en tertiles en fonction de la concentration plasmatique basale de cholestanol, afin de déterminer des sujets faibles, intermédiaires ou forts absorbeurs.

ARTICLE 1

The effects of Mediterranean-type diet on surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis, and cholesterol levels in subjects with moderate cardiovascular risk factors.

Estelle Wolff^{1,2}, Marie-France Vergnes¹, Henri Portugal^{1,2}, Catherine Defoort¹, Denis Lairon¹,
Alain Nicolay^{1,2}

RUNNING HEAD: Diet, cholesterol absorption and homeostasis

KEYWORDS : nutrition, humans, intervention, non-cholesterol sterols, Mediterranean diet.

¹ INRA, UMR1260 and INSERM ERL1025 “Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques”, Facultés de Médecine et de Pharmacie IPHM-IFR 125, 27 Boulevard Jean Moulin, Marseille, 13385 Cedex 05, France.

² Laboratoire de Biochimie-Hématologie Sud, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Article soumis à *J Nutr*

Abstract

Background: LDL cholesterol reduction may be obtained by various types of low-saturated fat/low-cholesterol diet, but the effects of such diets on surrogate markers of cholesterol metabolism have not been well studied in humans.

Objectives: To assess whether the extent of cholesterol absorption or synthesis, and cholesterol levels, are modified in adult subjects when shifting from a Western-type diet (WD) to a low-fat/low-cholesterol, Mediterranean-type diet (LFLCD).

Design: Cholestanol and sitosterol, as well as desmosterol and lathosterol, surrogate markers of cholesterol absorption or synthesis, respectively, were quantified in the fasting sera of 125 middle-aged subjects at moderate cardiovascular risk under a WD and after 3-months on a LFLCD. Population was ranked to high, intermediate and low-absorbers of cholesterol according to the cholestanol level.

Results: Under the usual WD, subjects presented comparable total and LDL-cholesterol concentrations whatever the absorber group and sex. After 3-months on a LFLCD, levels of absorption and synthesis slightly changed (cholestanol increased in low-absorbers by 18% and decreased in high-absorbers by 14%, but these variations did not change the absorber status. The lowering of plasma (-7%) and LDL (-9%) cholesterol after 3-mo LFLCD was significant in the low-absorbers only, and with a 2.4 fold greater extent than in high-absorbers, and was comparable in the two sexes.

Conclusions: Our data show that the cholesterol synthesis/absorption status is not markedly altered by diet but that the LDL-cholesterol lowering induced by a Mediterranean-type diet is marked in low-absorbers only. This should be considered to have further successful dietary interventions.

Introduction

Dietary habits play a key role in the development of cardiovascular diseases (CVD). Especially, diets rich in saturated fat or cholesterol are well-known to increase concentrations of fasting plasma total cholesterol and LDL-cholesterol, which are among other acknowledged key risk factors for atherosclerosis and coronary heart disease (1, 2).

The main dietary sources of sterols are animal-derived cholesterol and plant-derived phytosterols. Mean cholesterol intakes are about 300-500 mg/d in common occidental diets while those for phytosterols are about 100-400 mg or even higher (1-3 g/d) in subjects having phytosterol-enriched foods (3, 4). In the human plasma, levels of cholesterol are 1,000 to 20,000 times higher than non-cholesterol sterols (5). This is partly explained by minor differences in the structure of such molecules which result in negligible rates of uptake (0.4 to 3.5 % (6)) of luminal phytosterols by the small intestine compared with the one of cholesterol (29-80 % (7)), excepting rare patients suffering from sitosterolemia (8). This is also due to the fact that animals do not synthesize plant-type sterols but synthesize important amounts of cholesterol (about 1 g/d in humans) (9). It is noteworthy that serum plant sterol levels can vary widely among individuals but that they are rather stable over time for a given individual (10, 11).

It has been shown for decades that a variety of sterol moieties present in the circulation can be either surrogate markers of cholesterol de novo endogenous synthesis (i.e. desmosterol, lathosterol) or surrogate markers of the rate of cholesterol intestinal absorption (i.e. cholestanol, campesterol, sitosterol) (12). Such indirect markers have widely been used to evaluate the changes in the levels of either cholesterol synthesis and/or absorption in healthy subjects or various kind of patients, under diverse contexts. Other studies have shown the associations existing between the circulating levels of these markers and the extent of hypercholesterolemia (13) or hyperLDLemia (14) and/or CVD risk (15-17). In fact, the rate of intestinal cholesterol absorption is highly variable in human subjects (range 29-80%)(7) as well as the response of circulating total and LDLcholesterol to dietary cholesterol(18). Sub-grouping subjects or patients based on their surrogate marker levels

made possible to evaluate their responsiveness to treatments with statins (19-21) or ezetimibe (14), but rarely to test the influence of different dietary regimens (13, 22).

We thus aimed to answer two important questions. First, are there associations between the plasma levels of synthesis and absorption cholesterol surrogate markers and LDL cholesterol or other CVD risk factors under various dietary regimes? Second, do different dietary regimes influence the levels of cholesterol endogenous synthesis and/or absorption?

To that aim, we took advantage of the MEDI-Rivage study, a dietary intervention in untreated adult subjects (men and women) at moderate CVD risk (23). As published (23), they relied on a Western-type diet (WD) at entry and experienced low-saturated fat, low-cholesterol, Mediterranean-type diets (LFLCD) for 3-months. Overall, the main changes observed in the whole cohort were decreased body mass index (BMI), plasma cholesterol (Chol) and LDL-cholesterol (LDL-c), insulinemia and HOMA score under LFLCD and in both men and women. In the present work, we measured serum non-cholesterol sterols in 125 subjects before and after 3-month LFLCD intervention and determined possible associations between diet, levels of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis, and some CVD risk factors.

Subjects and methods

Subjects

The design and the population of the Medi-RIVAGE study have been previously reported (23, 24). In the present work, the plasma sterol markers of cholesterol metabolism have been assessed in 125 middle-aged Caucasian subjects. Briefly, 53 men and 72 women, aged 22-70 y, were selected at the Center for Detection and Prevention of Atherosclerosis at La Timone University Hospital (Marseille, France) according to at least one of the eligibility criteria (23). All volunteers presented moderate and untreated cardiovascular risk factors (including hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hypertension, BMI above 27). Hypolipemic and hypoglycemic drugs were exclusion criteria.

At entry, the dietary habits of subjects were typical of a Western-type diet (WD). The aim of the nutritional intervention was to reduce saturated fatty acids and cholesterol intakes by advising the subjects to follow, for 3 months, a Mediterranean-type diet (n=64) or a low-fat type diet (n=61). To check compliance to dietary recommendations, dieticians used 3-days food records at entry and after 3 months and 24 hours unscheduled dietary recalls once a month. The dietary records were analysed using the GENI program (Micro6, Nancy, France) based on the French REGAL food database (24).

To define absorber status, subjects were ranked into tertiles (low, intermediate and high cholesterol absorption efficiency groups) according to baseline serum cholestanol to the cholesterol ratio (25). The cut-off values ratios of these ratio (102 mmol cholestanol/mol of cholesterol) were < 112 (low-absorber), < 155 and > 112 (intermediate absorber) and > 155 (high-absorber).

Analytical Methods

Biochemical and anthropometric data were collected at baseline under WD and after 3 months (3-mo) under LFLCD. Fasting plasma total cholesterol (C), Triglyceride-rich lipoprotein-cholesterol (TRL-C), triglycerides and TRL-triglycerides (TRL-TG), and glucose and insulin concentrations were measured using standard methods, as reported in details (23). HDL-cholesterol (HDL-C) was measured after sodium phosphotungstate-magnesium chloride precipitation. LDL-cholesterol (LDL-C) was estimated using the Friedewald equation. Insulin resistance status was estimated by the homeostasis model assessment (HOMA) (26) and the global CVD risk by the Framingham score (1).

Fasting serum non-cholesterol sterols (cholestanol, sitosterol, campesterol, desmosterol and lathosterol) were quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Hewlett-Packard 6890 GC-5973 MS) equipped with a Zebron-1 capillary column (50 m × 0.25 mm i.d., 0.50 µm film thickness) (27).

Since circulating non-cholesterol sterols are transported along with cholesterol in lipoproteins, the absolute concentrations of absorption and synthesis markers were adjusted for concentration of cholesterol and were expressed as a ratio (102 mmol/mol cholesterol) as made by others (12, 28). The data were thus not confounded by the changes in lipoprotein cholesterol level. The ratios to serum cholesterol of cholestanol, sitosterol and campesterol reflect cholesterol absorption, whereas ratios to serum cholesterol of desmosterol and lathosterol reflect cholesterol synthesis (25, 29, 30). In addition to the assessment of single absorption and synthesis markers, cholesterol homeostasis can be investigated using ratios of serum cholesterol synthesis markers/absorption markers. Thus, were also calculated the ratios of Lathosterol/Campesterol and Lathosterol/Cholestanol (15, 17, 21, 31).

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted with SPSS software (v17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data are expressed as means \pm SEMs. Logarithmic transformation was performed on individual values of plasma and Framingham score to improve the normality of their distribution.

Statistical significances between the Mediterranean-diet and the low-fat diet sub-groups (23) were tested with univariate general linear models for plasma cholesterol parameters and serum non-cholesterol sterols (data not shown). There were no significant differences between the sub-groups with the two variants of intervention diets, in agreement with observations previously reported (24, 27). Thus, all subjects on the so-called low-fat, low-cholesterol, Mediterranean-type diet (LFLCD) were subsequently pooled for data analyses. Comparison between absorber's groups at entry under WD was tested with general linear models and comparison between absorber's group in their response to 3-mo LFLCD was tested with repeated measures general models. Age was always included in the adjustment. Intragroup comparison between entry and 3-mo data was performed with Student's *t* paired test. For some parametric variables of interest, Pearson correlation coefficients were calculated. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characteristics of subjects and nutritional data under a Western-type diet (WD)

Table 1 lists the main characteristics of the 125 subjects belonging to the MEDI-Rivage cohort as studied herein and under a WD at entry.

At entry, age, BMI, total and LDL-cholesterol, glucose, insulin, Framingham and HOMA scores were comparable between men and women, whereas significant differences were observed for HDL-C, TRL-C, triglycerides, TRL-TG, Apolipoprotein A1 and Diastolic Blood Pressure. Fasting plasma cholesterol ranged 4.26 to 9.54 mmol/L in women and 4.67 to 8.74 mmol/L in men. About 54 % women and 45 % men had hypercholesterolemia (cholesterol >6.5mmol/L). The proportion of hypercholesterolemic subjects was not statistically different in the three groups of cholesterol absorbers (51.2%, 52.4% and 47.6% in high-, intermediate- and low-absorbers, respectively). Moreover, 72% subjects had a BMI above 25, 26% had triglyceridemia > 1.7 mmol/L, 11% had hyperglycemia (glucose > 6 mmol/L) and 23 % had a systolic blood pressure higher than 140 mm Hg.

As described in Table 2, energy intake (expressed as kJ/d) under a WD at entry was not different between absorber groups. In addition, protein, carbohydrate, fat (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) and cholesterol intakes were comparable whatever the cholesterol absorber's status and the sex at entry.

Cholesterol homeostasis and biochemical parameters under a WD

At entry under a WD, cholestanol, sitosterol and campesterol plasma levels gradually increased from low-absorbers towards high-absorbers irrespective of sex (Table 3). Levels of cholesterol synthesis, reflected by desmosterol and lathosterol concentrations, were also higher among the high-absorbers relative to low-absorbers. In contrast, the ratios of synthesis to absorber markers (lathosterol/campesterol and lathosterol/cholestanol) were significantly higher in the group of low-cholesterol absorbers compared to high-absorbers.

Table 4 reports the fasting biochemical parameters according to extreme groups of cholesterol absorbers and sex. At entry, subjects elicited a comparable biochemical profile whatever the levels of cholesterol absorption and synthesis, except for plasma insulin which was higher in low-absorbers.

As shown in Table 5, the synthesis/absorption marker ratios were positively correlated with TRL-C, TRL-TG and insulin whereas an inverse relationship was observed with HDL-C. A noticeable association between the synthesis/absorption marker ratios and insulin, HOMA score and TG was found in women only.

Cholesterol homeostasis and biochemical parameters under a LFLCD

As expected, the 3-mo dietary intervention with LFLCD significantly altered quality and amount of nutrient intakes, particularly with a reduction of saturated fat and cholesterol intakes ($p < 0.05$ whatever the absorber status) (Table 2). High and low-absorber groups decreased energy intake over the 3-mo study period, but the decrease was greater in the low-absorber group. A better adherence to the LFLCD was observed in women compared to men. Consequently, a greater decrease of nutrient intakes, especially fat, was observed in women (data not shown). However, the reduction of cholesterol intakes remained comparable between groups (-47%, -44% and -36% for low-, intermediate- and high-absorbers, respectively). There were no significant differences in the intakes of dietary cholesterol between men and women according to the absorber group at entry and after 3-mo of LFLCD ($p=0.201$ and $p=0.338$ in men; $p=0.327$ and $p=0.177$ in women, under WD and LFLCD, respectively).

After the 3-mo dietary intervention with LFLCD, high-absorbers for cholesterol presented a trend to reducing their cholesterol absorption and synthesis (Table 3). In contrast, low-absorbers raised their absorption level (based on an increase of cholestanol, sitosterol and campesterol levels). This increase in cholesterol absorption markers was not balanced by a manifest reduction of desmosterol or lathosterol levels in low-absorbers. The serum ratios of synthesis to absorption

markers, i.e. lathosterol/campesterol or lathosterol/cholestanol did not show any significant variation in the whole population, nor in men or women. Ratios of synthesis to absorption markers stayed more elevated in low-absorbers after 3-mo of LFLCD.

The effects of the 3-mo LFLCD on biochemical parameters appeared different according to absorber's status and sex (Table 4). Although BMI, cholesterol, HDL-C, LDL-C, TRL-C, TRL-TG and TG levels were comparable between absorber groups after LFLCD, the intra-group variations of these parameters were significantly different. Indeed, we observed a marked decrease of plasma cholesterol and LDL-C in low-absorbers, but not in high-absorbers, and in both sexes. In contrast, HDL-C increased and TRL-C significantly decreased in high-absorber men only.

After LFLCD, insulinemia remained higher in low-absorbers irrespective of sex and the HOMA score was higher in low-absorbers but significantly decreased in both groups.

Discussion

The present study provided two main and original findings. First, we showed herein that the cholesterol absorption status under a Western-type diet (WD), based on plasma surrogate markers, remained unchanged after 3-mo on a low-saturated fat, low-cholesterol, Mediterranean-type diet (LFLCD). Secondly, the circulating levels of plasma and LDL cholesterol were altered both by the dietary regime and the cholesterol absorption status, but not sex.

In fact, numerous previous studies used non-cholesterol sterols as markers for cholesterol homeostasis assessment(14-17, 31-33) but only a few nutritional interventions used indirect markers of absorption and synthesis to study the modulation of cholesterol synthesis/absorption status through a dietary challenge(13, 22), and none with a Mediterranean-type diet.

In literature, various indirect synthesis and absorption markers of cholesterol are reported to check cholesterol homeostasis in place of the direct and sophisticated method based on stable isotope labelling (12). Cholestanol, a predictor of recurrent coronary events (15, 19, 20) and of a poor response to statins (21) could be considered as the best cholesterol absorption marker because it is

not influenced by dietary intakes of plant sterols contrary to campesterol and sitosterol (22, 25, 34). Thus, we sub-grouped the 125 subjects studied into tertiles according to cholestanol concentrations providing groups with a high-, intermediate- or low-cholesterol absorber status. In order to better interpret differences based on cholesterol absorption status, we then compared the biochemical parameters of the two extreme groups, i.e. low- and high-absorbers only. Furthermore, our study was carried out in both sexes. Although efficiency of cholesterol absorption seems to be comparable in men and women as reported (7, 11, 32), the responsiveness to diets could be partly sex-specific. For example, MEDI-Rivage cohort subjects were shown to display genotypes by sex and diet interactions for I-FABP (Intestinal fatty acid binding protein) and MTP (Microsomal triglyceride transfer protein), which have essential roles in lipid absorption and re-secretion (27, 35). It was therefore, interesting to also consider sexes separately.

Our first key finding (based on Table 3 data) was the unchanged cholesterol absorption status after dietary challenge with LFLCD. This occurred despite a slightly higher decrease in energy (kJ/d) and fat (g/kg/bw) intakes in low-absorbers (-30.6% and -41.4%, respectively) compared to high-absorbers (-19.4% and -26.7%, respectively) when shifting from a WD to a LFLCD. More importantly were the equivalent cholesterol intakes in the three groups of cholesterol absorbers, which thus did not confound the observations made. It was worthwhile to observe that cholesterol absorption markers increased in low-absorbers and decreased in high-absorbers after the LFLCD. This highlights the different adaptive responses in these subject groups to the lower intakes of dietary cholesterol upon LFLCD (about 300 vs 175 mg/d under WD) but the amplitude of these changes was not large enough to modify the initial low/high cholesterol absorption status of the subjects. Moreover, lathosterol/campesterol and lathosterol/cholestanol ratios remained also higher in low-absorbers after 3-mo under LFLCD, which suggests that these ratios were not markedly influenced by LFLCD. Thus, decreasing dietary cholesterol and saturated fatty acids intakes (table 2) did not change the high- or low-absorption status of the vast majority (90%) of subjects. This finding is consistent with those of another human study which showed that variable amounts of

dietary fat and cholesterol did not alter the sensitivity of plasma non-cholesterol sterols to fluctuations of cholesterol metabolism under controlled diets(22). This is in line with the observation that the levels of cholesterol synthesis and absorption markers are noticeably stable over time within individuals (11) and support the concept that determinants of cholesterol absorption status mainly rely on intrinsic subject characteristics, especially genetic ones (11).

In contrast, some outcomes of the 3-mo LFLCD intervention were influenced both by the absorption status and sex of the subjects.

As expected based on the low reduction in energy intake, BMI slightly decreased in both groups under LFLCD, but independently of cholesterol absorber status and sex. We observed positive associations between BMI and cholesterol synthesis markers ($r=0.271$ and $p=0.002$ for lathosterol, $r=0.186$ $p=0.039$ for desmosterol) and also for the ratios of lathosterol to campesterol ($r=0.263$ and $p=0.003$) and lathosterol to cholestanol ($r=0.268$ and $p=0.003$). Such relationships are in agreement with literature reporting an association between cholesterol synthesis and body weight (32) or an inverse relation with absorption markers and BMI (16). However, weight loss was reported to cause a decrease in cholesterol synthesis without necessary compensatory increase in absorption status (33, 36).

Our second key finding was that the response to a given diet of plasma biochemical parameters can be modulated by the cholesterol absorption status of the subjects determined at entry. Regarding plasma biochemical parameters, total cholesterol and LDL cholesterol tended to decrease in low- and high-absorbers and both sexes, but very interestingly, this reduction was only marked and significant in low-absorbers (- 8.6 % vs - 3.6 %). In contrast, no noticeable change in TG levels was observed at that time, which indicates that the reduction in dietary intakes of cholesterol and saturated fatty acids upon LFLCD produced a unique effect on plasma and LDL cholesterol levels as regards to cholesterol absorption status. This finding leads us to suggest that a low intake of dietary cholesterol (ie about 175 mg/d), as occurring under the LFLCD tested herein, generates a much larger LDL cholesterol lowering in subject with a low cholesterol absorption

efficiency. Conversely, those subjects with a high absorption status elicit a negligible beneficiary response to dietary cholesterol reduction in terms of LDL cholesterol. This could be explained by a higher intestinal influx of dietary/biliary cholesterol in high-absorbers compared to low-absorbers which cannot be accommodated by a concomitant and sufficient reduction in de novo cholesterol synthesis. Given highly variable responses of plasma or LDL cholesterol to dietary cholesterol have already been reported in humans (18) it should be worthwhile to further study in large subject cohorts, whether the cholesterol absorption status relates to LDL cholesterol response to dietary intakes and, which are the main determinants involved, including gene polymorphisms.

It is noteworthy that we found that plasma insulin was higher in low-absorbers, whatever the dietary regime, which is consistent with other studies (31, 33, 37). Under WD, insulinemia was positively correlated with the lathosterol/campesterol ratio ($r= 0.233$ $p=0.011$) and lathosterol/cholestanol ratio ($r= 0.312$ $p=0.001$), associations which were stronger in women ($r= 0.423$ $p<0.001$ and $r= 0.438$ $p<0.001$ for lathosterol/campesterol and lathosterol/cholestanol ratio, respectively). In this line, we also found that the HOMA score was positively correlated with synthesis/absorption ratios in women, and more markedly in the low-absorber women. Taken together, these data suggest a sex-specific interaction between insulinemia and cholesterol absorption status. Clear relationships have already been reported between cholesterol and glucose metabolisms (31, 38) and even non-diabetic subjects with high to normal glucose level showed low absorption efficiency and high synthesis of cholesterol (31, 39). Indeed, insulin action enhances cholesterol synthesis and down-regulate the cholesterol absorption by still unknown mechanisms(31).

One limitation of this study is that the MEDI-Rivage cohort was rather heterogeneous, because subject selection was based on at least one risk factor for CVD, but had the advantage of involving untreated subjects of both sexes at moderate CVD risk. A second limitation of the MEDI-Rivage study is that the phytosterol intakes have not been measured and could have influenced, even minimally, the plasma sitosterol and campesterol sterol levels (22, 40). Nevertheless, it is not likely

that phytosterol intakes varied upon LFLCD differently in the low- or high-absorber subjects, given this was not observed for other important nutrients (Table 2).

In conclusion, the present study performed in 125 men and women at moderate cardiovascular risk provides two important informations. First, the synthesis/absorption balance for cholesterol, the key for cholesterol homeostasis, is likely an intrinsic trait of the subjects being not noticeably altered by changing the diet (Western-type vs prudent-type), mainly in terms of fatty acids and cholesterol. This applies both to men and women, thus without apparent sex specificity. Secondly, we showed that the cholesterol absorption status of both men and women is a clear determinant of the responsiveness to a healthy dietary challenge by predicting the lowering of LDL cholesterol in those subjects with a cholesterol low-absorption status. Finally, the observed relationship between insulin resistance status and cholesterol synthesis/absorption status appeared more evident in women than men. Overall, the data obtained stress the importance of a better knowledge of the subject intrinsic characteristics to plan successful dietary interventions.

Acknowledgments

Supported by the French Research Minister (AQS grant), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (IDS grant), the Provence-Alpes-Côte d'Azur Regional Council, the Bouches du Rhône General Council and the Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologies-Provence-Alpes-Côte d'Azur.

The authors thank MC Bernard, M. Gerber and P. Vague for their active role during the intervention study, Julien Mancini for his statistical help.

E Wolff, MF Vergnes, C Defoort, H Portugal, A Nicolay and D Lairon : no conflicts of interest.

References

1. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med.* 1984;76:4-12.
2. NCEP. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation.* 2002;106:3143-421.
3. Andersson SW, Skinner J, Ellegard L, Welch AA, Bingham S, Mulligan A, Andersson H, Khaw KT. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1378-85. doi:10.1038/sj.ejcn.1601980
4. Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:533-49. doi:10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220
5. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol.* 2005;96:10D-4D. doi:10.1016/j.amjcard.2005.03.014
6. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis.* 2009;203:18-31. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.026
7. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE, Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res.* 1999;40:302-8.
8. Patel MD, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis.* 2006;186:12-9. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.026
9. Wilson MD, Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res.* 1994;35:943-55.

10. Plat J, Bragt MC, Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res.* 2005;46:68-75. doi:10.1194/jlr.M400210-JLR200
11. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res.* 2002;43:486-94.
12. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol.* 1990;131:20-31.
13. Sarkkinen ES, Uusitupa MI, Gylling H, Miettinen TA. Fat-modified diets influence serum concentrations of cholesterol precursors and plant sterols in hypercholesterolemic subjects. *Metabolism.* 1998;47:744-50.
14. Hiramitsu S, Ishiguro Y, Matsuyama H, Yamada K, Kato K, Noba M, Uemura A, Yoshida S, Matsubara Y, et al. The effects of ezetimibe on surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis in Japanese patients with dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17:106-14. doi:JST.JSTAGE/jat/1578
15. Matthan NR, Pencina M, Larocque JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Alterations in cholesterol absorption and synthesis characterize Framingham offspring study participants with coronary heart disease. *J Lipid Res.* 2009. doi:10.1194/jlr.P900039-JLR200
16. Pinedo S, Vissers MN, von Bergmann K, Elharchaoui K, Lutjohann D, Luben R, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Plasma levels of plant sterols and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J Lipid Res.* 2007;48:139-44. doi:10.1194/jlr.M600371-JLR200
17. Fassbender K, Lutjohann D, Dik MG, Bremmer M, Konig J, Walter S, Liu Y, Letiembre M, von Bergmann K, Jonker C. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced

- cardiovascular risk--the LASA study. *Atherosclerosis*. 2008;196:283-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.10.032
18. McNamara D. Cholesterol intake and plasma cholesterol: an update. *J Am Coll Nutr*. 1997;16:530-4.
19. Miettinen TA, Gylling H, Strandberg T, Sarna S. Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S Investigators. *BMJ*. 1998;316:1127-30.
20. Miettinen TA, Strandberg TE, Gylling H. Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients: relation to basal serum cholestanol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1340-6.
21. Nissinen MJ, Miettinen TE, Gylling H, Miettinen TA. Applicability of non-cholesterol sterols in predicting response in cholesterol metabolism to simvastatin and fluvastatin treatment among hypercholesterolemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20:308-16. doi:10.1016/j.numecd.2009.04.014
22. Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr*. 2008;99:370-8. doi:10.1017/S0007114507811998
23. Vincent S, Gerber M, Bernard MC, Defoort C, Loundou A, Portugal H, Planells R, Juhan-Vague I, Charpiot P, et al. The Medi-RIVAGE study (Mediterranean Diet, Cardiovascular Risks and Gene Polymorphisms): rationale, recruitment, design, dietary intervention and baseline characteristics of participants. *Public Health Nutr*. 2004;7:531-42. doi:S136898000400062X
24. Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolier P, et al. The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:964-71. doi:82/5/964

25. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism*. 1989;38:136-40. doi:0026-0495(89)90252-7
26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
27. Wolff E, Vergnes M-F, Defoort C, Planells R, Portugal H, Nicolay A, Lairon D. Cholesterol absorption status and fasting plasma cholesterol are modulated by the microsomal triacylglycerol transfer protein -493 G/T polymorphism and the usual diet in women. *Genes Nutr*. 2010;1-9. doi:10.1007/s12263-010-0174-x
28. Miettinen TA. Diurnal variation of cholesterol precursors squalene and methyl sterols in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. 1982;23:466-73.
29. Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr*. 1986;43:92-7.
30. Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res*. 1988;29:1149-55.
31. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Simonen P, Kuusisto J, Laakso M, Miettinen TA. Insulin sensitivity regulates cholesterol metabolism to a greater extent than obesity: lessons from the METSIM Study. *J Lipid Res*. 2010;51:2422-7. doi:10.1194/jlr.P006619
32. Kempen HJ, de Knijff P, Boomsma DI, van der Voort HA, Gevers Leuven JA, Havekes L. Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism*. 1991;40:604-11. doi:0026-0495(91)90051-W
33. Simonen P, Gylling H, Howard AN, Miettinen TA. Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:82-8.

34. Ostlund RE, Jr., Racette SB, Stenson WF. Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterols, oxysterols, and squalene. *Nutr Rev.* 2002;60:349-59.
35. Gastaldi M, Diziere S, Defoort C, Portugal H, Lairon D, Darmon M, Planells R. Sex-specific association of fatty acid binding protein 2 and microsomal triacylglycerol transfer protein variants with response to dietary lipid changes in the 3-mo Medi-RIVAGE primary intervention study. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1633-41. doi:86/6/1633
36. Santosa S, Varady KA, AbuMweis S, Jones PJ. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci.* 2007;80:505-14. doi:10.1016/j.lfs.2006.10.006
37. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R, Miettinen TA. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res.* 2004;45:1660-5. doi:10.1194/jlr.M300522-JLR200
38. Smahelova A, Hyspler R, Haas T. Relation of cholesterol metabolism and non-cholesterol sterols to insulin resistance. *Physiol Res.* 2007;56:749-55. doi:1065
39. Gylling H, Hallikainen M, Kolehmainen M, Toppinen L, Pihlajamaki J, Mykkanen H, Agren JJ, Rauramaa R, Laakso M, Miettinen TA. Cholesterol synthesis prevails over absorption in metabolic syndrome. *Transl Res.* 2007;149:310-6. doi:10.1016/j.trsl.2006.11.012
40. Vanstone CA, Jones PJ. Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:340-1.

Table 1: Characteristics of subjects at entry under a Western-type diet ^a

Variables	All n=125	Men n=53	Women n=72	P value ^b
Age (years)	51.70 ± 0.89	50.15 ± 1.49	52.85 ± 1.09	ns
Body Mass Index (kg/m ²)	28.28 ± 0.40	28.26 ± 0.48	28.29 ± 0.60	ns
Total cholesterol (mmol/L)	6.53 ± 0.09	6.40 ± 0.13	6.63 ± 0.11	ns
HDL-cholesterol	1.53 ± 0.04	1.36 ± 0.05	1.65 ± 0.06	<0.001
LDL-cholesterol	4.21 ± 0.08	4.13 ± 0.13	4.27 ± 0.11	ns
TRL-cholesterol	1.22 ± 0.11	1.62 ± 0.23	0.94 ± 0.08	0.002
Apolipoprotein A1	1.47 ± 0.03	1.36 ± 0.04	1.55 ± 0.04	<0.001
Apolipoprotein B	1.259 ± 0.02	1.252 ± 0.03	1.264 ± 0.03	ns
Triglycerides (mmol/L)	1.54 ± 0.08	1.84 ± 0.15	1.32 ± 0.08	0.001
TRL-triglycerides ^c	1.09 ± 0.09	1.46 ± 0.20	0.84 ± 0.07	0.001
Glucose (mmol/L)	5.23 ± 0.05	5.35 ± 0.09	5.15 ± 0.06	0.056
Insulin (mUI/L)	10.45 ± 0.56	10.95 ± 0.85	10.08 ± 0.76	ns
HOMA score	2.47 ± 0.15	2.62 ± 0.22	2.37 ± 0.21	ns
Systolic Blood Pressure (mmHg)	126.58 ± 1.55	127.91 ± 2.11	125.61 ± 2.20	ns
Diastolic Blood pressure (mmHg)	77.98 ± 0.96	80.91 ± 1.46	75.80 ± 1.22	0.008
Framingham Score	6.05 ± 0.27	5.98 ± 0.40	6.10 ± 0.36	ns

^a Values are mean ± SEM.

^b Comparison between sex tested by General Linear Models adjusted to age. ns: non significant ($p>0.05$)

^c TRL: Triglycerides Rich Lipoproteins.

Table 2 : Daily nutrient intakes of subjects at entry under a Western-type diet (WD) and after a 3-mo low-saturated fat, low-cholesterol Mediterranean type-diet (LFLCD) according to absorber status markers^a.

	Cholesterol absorber status			<i>p</i> value* ^b	<i>p</i> value** ^b
	High n=41	Intermediate n=42	Low n=42		
Total energy (kJ)					
Entry	7958 ± 355	8391 ± 410	8105 ± 345	0.704	ns
3 months	6413 ± 247	6317 ± 275	5624 ± 220	0.053	0.019
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	<0.001		
Total protein (g/kg bw^d)					
Entry	87.2 ± 3.2	93.9 ± 4.5	85.9 ± 3.6	0.280	ns
3 months	76.7 ± 3.4	75.8 ± 3.2	68.2 ± 2.7	0.103	0.051
<i>p</i> value ^c	0.006	<0.001	<0.001		
Carbohydrates (g/kg bw)					
Baseline	206.1 ± 11.4	203.0 ± 9.0	209.3 ± 10.8	0.913	ns
3 months	176.6 ± 8.4	172.4 ± 8.3	157.2 ± 7.2	0.197	ns
<i>p</i> value ^c	0.005	<0.001	<0.001		
Total fat (g/kg bw)					
Entry	81.2 ± 4.7	91.1 ± 6.2	84.2 ± 4.3	0.381	ns
3 months	57.9 ± 2.8	57.6 ± 3.1	49.3 ± 2.2	0.044	0.017
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	<0.001		
SFA (g/kg bw)^e					
Entry	29.8 ± 2.0	34.0 ± 2.9	30.8 ± 1.9	0.395	ns
3 months	17.0 ± 1.0	16.9 ± 1.1	14.5 ± 0.7	0.108	0.038
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	<0.001		
MUFA (g/kg bw)^f					
Entry	30.5 ± 1.7	33.1 ± 2.1	30.8 ± 1.8	0.575	ns
3 months	23.8 ± 1.2	23.8 ± 1.5	20.9 ± 1.1	0.181	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	<0.001		
PUFA (g/kg bw)^g					
Entry	11.2 ± 0.8	11.4 ± 0.8	12.0 ± 0.8	0.761	ns
3 months	10.2 ± 0.7	10.2 ± 0.9	8.8 ± 0.6	0.292	ns
<i>p</i> value ^c	0.302	0.219	<0.001		
Dietary cholesterol (mg)					
Entry	300.0 ± 17.3	338.2 ± 25.7	305.4 ± 18.8	0.381	ns
3 months	191.3 ± 15.5	189.5 ± 13.0	160.7 ± 9.2	0.169	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	<0.001		

^a Values are mean ± SEM

^b Comparison between absorber's groups (* between tertiles; ** between high and low-absorbers) at entry under a Western-type diet (WD) and 3-mo after a low-saturated fat, low-cholesterol Mediterranean type-diet (LFLCD) tested with General Linear Models (GLM).

ns: non significant ($p > 0.05$)

^c $p < 0.05$ for comparison between entry and 3-mo within groups (calculated by Student t paired test).

^d g/kg bw: g/kg of body weight

^e SFA. saturated fatty acids (g/day)

^f MUFA. monounsaturated fatty acids(g/day)

^g PUFA. polyunsaturated fatty acids (g/day)

Table 3 : Cholesterol homeostasis markers at entry under a Western-type diet (WD) and after a 3-mo under a low-saturated fat, low-cholesterol Mediterranean type-diet (LFLCD)^a

		Cholesterol absorber status			p*value ^b	p**value ^b
		High n=41	Intermediate n=42	Low n=42		
Cholestanol^{c,f}						
All ^g	Entry	210.6 ± 7.2	133.1 ± 1.8	81.9 ± 3.2	<0.001	<0.001
	Month 3	181.6 ± 6.8	152.3 ± 7.0	96.3 ± 6.7	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.004	0.003	0.016		
	Mean changes	-29.0 ± 9.6	19.2 ± 6.2	14.5 ± 5.8	<0.001	<0.001
Men ^h	Entry	189.52 ± 6.91	132.36 ± 2.69	83.98 ± 5.19	<0.001	<0.001
	Month 3	176.14 ± 12.27	143.35 ± 9.00	97.43 ± 10.74	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.247	0.163	0.206		
	Mean changes	-13.39 ± 11.14	11.00 ± 7.60	13.45 ± 10.15	0.105	0.088
Women ⁱ	Entry	225.48 ± 10.25	133.87 ± 2.40	80.68 ± 4.08	<0.001	<0.001
	Month 3	185.50 ± 7.96	161.34 ± 10.61	95.71 ± 8.68	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.009	0.010	0.045		
	Mean changes	-39.98 ± 14.05	27.47 ± 9.63	15.03 ± 7.14	<0.001	0.001
Sitosterol^c						
All	Entry	196.9 ± 16.5	104.5 ± 6.3	64.1 ± 5.6	<0.001	<0.001
	Month 3	176.4 ± 12.6	126.8 ± 9.2	90.5 ± 11.7	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.143	0.012	0.033		
	Mean changes	-20.5 ± 13.7	22.2 ± 8.5	25.8 ± 11.6	0.008	0.012
Men	Entry	184.71 ± 19.17	115.05 ± 8.91	71.68 ± 8.07	<0.001	<0.001
	Month 3	169.98 ± 19.31	125.91 ± 10.11	81.88 ± 9.98	<0.001	0.001
	p value ^e	0.355	0.204	0.255		
	Mean changes	-14.73 ± 15.47	10.86 ± 8.27	10.20 ± 8.59	0.194	0.185
Women	Entry	205.52 ± 24.99	94.05 ± 8.59	59.83 ± 7.40	<0.001	<0.001
	Month 3	180.88 ± 16.91	127.62 ± 15.70	95.50 ± 17.66	0.002	0.001
	p value ^e	0.253	0.033	0.059		
	Mean changes	-24.64 ± 21.01	33.57 ± 14.67	34.74 ± 17.58	0.036	0.034
Campesterol^c						
All	Entry	266.8 ± 22.5	137.5 ± 9.8	89.6 ± 8.8	<0.001	<0.001
	Month 3	233.4 ± 17.9	169.4 ± 17.7	95.3 ± 8.9	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.096	0.059	0.479		
	Mean changes	-33.4 ± 19.6	32.0 ± 16.5	5.3 ± 7.5	0.013	0.071
Men	Entry	249.28 ± 24.35	134.31 ± 9.85	100.62 ± 15.67	<0.001	<0.001
	Month 3	245.84 ± 25.87	155.07 ± 17.64	103.20 ± 11.40	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.889	0.144	0.843		
	Mean changes	-3.44 ± 24.19	20.76 ± 13.65	2.58 ± 12.80	0.575	0.834
Women	Entry	279.20 ± 34.58	140.61 ± 17.19	83.26 ± 10.64	<0.001	<0.001
	Month 3	224.63 ± 24.80	183.82 ± 30.80	90.79 ± 12.41	<0.001	<0.001
	p value ^e	0.066	0.168	0.462		
	Mean changes	-54.58 ± 28.33	43.20 ± 30.22	7.01 ± 9.39	0.019	0.041
Desmosterol^c						
All	Entry	136.2 ± 5.9	129.2 ± 4.8	93.3 ± 5.4	<0.001	<0.001
	Month 3	114.9 ± 4.2	132.5 ± 5.0	106.7 ± 7.1	0.005	0.320
	p value ^e	0.001	0.471	0.005		
	Mean changes	-21.3 ± 5.9	2.4 ± 3.2	12.3 ± 4.1	<0.001	<0.001
Men	Entry	139.13 ± 8.64	146.78 ± 6.27	95.87 ± 10.23	<0.001	0.003
	Month 3	116.80 ± 5.71	154.21 ± 5.65	113.90 ± 13.34	0.001	0.836
	p value ^e	0.017	0.151	0.037		
	Mean changes	-22.33 ± 8.34	7.43 ± 4.97	18.03 ± 7.84	0.001	0.001
Women	Entry	134.15 ± 8.17	111.69 ± 5.09	91.86 ± 6.40	<0.001	<0.001
	Month 3	113.54 ± 5.91	109.70 ± 4.44	102.50 ± 8.23	0.479	0.288
	p value ^e	0.020	0.460	0.071		
	Mean changes	-20.60 ± 8.26	-2.95 ± 3.91	8.92 ± 4.73	0.003	0.003

Lathosterol^c						
All	Entry	199.0 ± 15.8	194.2 ± 11.4	124.0 ± 10.9	<0.001	<0.001
	Month 3	155.5 ± 9.7	185.4 ± 8.4	146.9 ± 16.4	0.060	0.653
	<i>p</i> value ^e	<0.001	0.310	0.066		
	Mean changes	-43.6 ± 11.3	-8.8 ± 8.6	21.1 ± 11.2	<0.001	<0.001
Men	Entry	209.04 ± 24.51	221.97 ± 17.01	133.36 ± 20.26	0.010	0.026
	Month 3	155.72 ± 15.20	214.58 ± 10.43	150.75 ± 23.18	0.008	0.856
	<i>p</i> value ^e	0.007	0.597	0.266		
	Mean changes	-53.32 ± 17.35	-7.38 ± 13.76	17.38 ± 14.99	0.010	0.005
Women	Entry	191.94 ± 20.93	166.45 ± 12.80	118.74 ± 12.79	0.005	0.004
	Month 3	155.29 ± 12.92	156.14 ± 9.65	144.60 ± 22.45	0.861	0.688
	<i>p</i> value ^e	0.024	0.347	0.147		
	Mean changes	-36.66 ± 15.12	-10.31 ± 10.71	23.28 ± 15.57	0.013	0.008
Lathosterol/campesterol^d						
All	Entry	1.02 ± 0.14	1.67 ± 0.13	1.97 ± 0.27	0.002	0.002
	Month 3	1.08 ± 0.25	1.51 ± 0.13	2.01 ± 0.23	0.008	0.007
	<i>p</i> value ^e	0.733	0.091	0.945		
	Mean changes	0.05 ± 0.16	-0.16 ± 0.09	-0.01 ± 0.14	0.483	0.763
Men	Entry	0.96 ± 0.14	1.81 ± 0.16	1.86 ± 0.40	0.019	0.035
	Month 3	0.78 ± 0.11	1.71 ± 0.17	1.67 ± 0.26	0.001	0.003
	<i>p</i> value ^e	0.091	0.476	0.431		
	Mean changes	-0.18 ± 0.10	-0.11 ± 0.15	-0.20 ± 0.24	0.920	0.935
Women	Entry	1.07 ± 0.21	1.52 ± 0.19	2.02 ± 0.35	0.046	0.027
	Month 3	1.29 ± 0.41	1.31 ± 0.19	2.21 ± 0.32	0.078	0.081
	<i>p</i> value ^e	0.402	0.079	0.534		
	Mean changes	0.22 ± 0.25	-0.22 ± 0.12	0.10 ± 0.16	0.278	0.707
Lathosterol/cholestanol^d						
All	Entry	0.97 ± 0.08	1.48 ± 0.09	1.52 ± 0.11	<0.001	<0.001
	Month 3	0.92 ± 0.07	1.32 ± 0.09	1.53 ± 0.12	<0.001	<0.001
	<i>p</i> value ^e	0.356	0.016	0.964		
	Mean changes	-0.05 ± 0.05	-0.15 ± 0.06	0.00 ± 0.09	0.305	0.660
Men	Entry	1.14 ± 0.14	1.70 ± 0.14	1.60 ± 0.21	0.034	0.066
	Month 3	0.98 ± 0.12	1.59 ± 0.11	1.52 ± 0.16	0.003	0.011
	<i>p</i> value ^e	0.091	0.206	0.574		
	Mean changes	-0.16 ± 0.09	-0.12 ± 0.09	-0.09 ± 0.15	0.907	0.686
Women	Entry	0.86 ± 0.08	1.25 ± 0.10	1.47 ± 0.14	0.001	<0.001
	Month 3	0.88 ± 0.09	1.06 ± 0.10	1.54 ± 0.16	0.001	0.001
	<i>p</i> value ^e	0.691	0.038	0.695		
	Mean changes	0.03 ± 0.07	-0.19 ± 0.09	0.04 ± 0.11	0.155	0.890

^a Values are mean ± SEM.

Mean changes are calculated as 3-mo value minus entry value.

^b Comparison between absorber's groups (* tertiles; ** between high and low-absorbers) at entry under Western-type diet (WD) tested with GLM and comparison between absorber groups in their response to a low-saturated fat, low-cholesterol Mediterranean type-diet (LFLCD) tested with repeated measures general models. All analyzes were adjusted for age.

^c 10² mmol/mol cholesterol.

^d mmol/mmol

^e $p < 0.05$ for intra-group comparison between entry and 3-mo (calculated by Student's t paired test).

^f Significant interaction of *absorber status* x *sex* at baseline ($p = 0.002$ between tertiles and $p = 0.005$ between low and high-absorbers) and significant interaction of *absorber status* x *sex* x *time* after 3 mo ($p = 0.043$).

^g Total population: high-absorbers $n = 41$; intermediate absorbers $n = 42$ and low-absorbers $n = 42$.

^h High-absorber's men: $n = 17$; Intermediate absorber men: $n = 21$; Low-absorber men: $n = 15$.

ⁱ High-absorber women: $n = 24$; Intermediate absorber women: $n = 21$; Low-absorber women: $n = 27$.

Table 4 : Fasting biochemical parameters at entry under a Western diet (WD) and after a 3-mo low-saturated fat, low-cholesterol Mediterranean type-diet (LFLCD) according to cholesterol absorber status^a

		Cholesterol absorber status		p value ^b
		High	Low	
Body Mass Index (kg/m²)				
All ^d	Entry	27.90 ± 0.78	28.15 ± 0.60	ns
	Month 3	26.70 ± 0.66	26.84 ± 0.52	ns
	p value ^c	<0.001	<0.001	
Men ^e	Entry	27.20 ± 0.90	28.15 ± 0.74	ns
	Month 3	25.95 ± 0.75	26.71 ± 0.49	ns
	p value ^c	0.001	<0.001	
Women ^f	Entry	28.40 ± 1.18	28.15 ± 0.85	ns
	Month 3	27.23 ± 1.00	26.91 ± 0.77	ns
	p value ^c	0.004	<0.001	
Total cholesterol (mmol/L)				
All	Entry	6.43 ± 0.18	6.51 ± 0.13	ns
	Month 3	6.22 ± 0.15	6.03 ± 0.14	ns
	p value ^c	0.091	<0.001	
Men	Entry	6.24 ± 0.28	6.56 ± 0.23	ns
	Month 3	6.24 ± 0.19	6.03 ± 0.26	ns
	p value ^c	0.988	0.004	
Women	Entry	6.56 ± 0.23	6.48 ± 0.16	ns
	Month 3	6.21 ± 0.22	6.03 ± 0.16	ns
	p value ^c	0.027	0.002	
HDL-C(mmol/L)				
All	Entry	1.47 ± 0.07	1.49 ± 0.06	ns
	Month 3	1.54 ± 0.07	1.41 ± 0.05	ns
	p value ^c	0.094	0.054	
Men	Entry	1.29 ± 0.08	1.41 ± 0.13	ns
	Month 3	1.48 ± 0.10	1.34 ± 0.10	ns
	p value ^c	0.017	0.294	
Women	Entry	1.60 ± 0.09	1.53 ± 0.07	ns
	Month 3	1.58 ± 0.10	1.45 ± 0.06	ns
	p value ^c	0.646	0.073	
LDL-C(mmol/L)				
All	Entry	4.13 ± 0.19	4.21 ± 0.12	ns
	Month 3	3.98 ± 0.13	3.85 ± 0.13	ns
	p value ^c	0.236	<0.001	
Men	Entry	3.99 ± 0.27	4.07 ± 0.21	ns
	Month 3	3.88 ± 0.19	3.69 ± 0.27	ns
	p value ^c	0.437	0.029	
Women	Entry	4.23 ± 0.25	4.28 ± 0.15	ns
	Month 3	4.06 ± 0.18	3.94 ± 0.13	ns
	p value ^c	0.382	0.008	

TRL-C (mmol/L)				
All	Entry	1.09 ± 0.13	1.34 ± 0.24	ns
	Month 3	1.04 ± 0.13	1.27 ± 0.21	ns
	<i>p</i> value ^c	0.056	0.522	
Men	Entry	1.54 ± 0.26	1.87 ± 0.64	ns
	Month 3	1.42 ± 0.27	1.89 ± 0.50	ns
	<i>p</i> value ^c	0.018	0.943	
Women	Entry	0.79 ± 0.09	1.07 ± 0.14	ns
	Month 3	0.80 ± 0.12	0.92 ± 0.11	ns
	<i>p</i> value ^c	0.860	0.350	
Glucose (mmol/L)				
All	Entry	5.30 ± 0.10	5.17 ± 0.10	ns
	Month 3	5.18 ± 0.09	4.97 ± 0.08	ns
	<i>p</i> value ^c	0.146	0.040	
Men	Entry	5.45 ± 0.17	5.42 ± 0.20	ns
	Month 3	5.29 ± 0.16	5.20 ± 0.16	ns
	<i>p</i> value ^c	0.216	0.290	
Women	Entry	5.20 ± 0.13	5.03 ± 0.10	ns
	Month 3	5.11 ± 0.11	4.85 ± 0.07	ns
	<i>p</i> value ^c	0.429	0.066	
Triglycerides (mmol/L)				
All	Entry	1.45 ± 0.14	1.46 ± 0.11	ns
	Month 3	1.27 ± 0.12	1.38 ± 0.10	ns
	<i>p</i> value ^c	0.107	0.441	
Men	Entry	1.90 ± 0.25	1.56 ± 0.18	ns
	Month 3	1.53 ± 0.22	1.67 ± 0.23	ns
	<i>p</i> value ^c	0.106	0.621	
Women	Entry	1.11 ± 0.13	1.41 ± 0.13	ns
	Month 3	1.07 ± 0.11	1.23 ± 0.09	ns
	<i>p</i> value ^c	0.710	0.122	
TRL-TG (mmol/L)				
All	Entry	0.92 ± 0.13	1.20 ± 0.21	ns
	Month 3	0.88 ± 0.12	1.06 ± 0.13	ns
	<i>p</i> value ^c	0.166	0.281	
Men	Entry	1.29 ± 0.26	1.65 ± 0.54	ns
	Month 3	1.23 ± 0.24	1.49 ± 0.29	ns
	<i>p</i> value ^c	0.063	0.635	
Women	Entry	0.66 ± 0.08	0.97 ± 0.13	ns
	Month 3	0.67 ± 0.10	0.81 ± 0.08	ns
	<i>p</i> value ^c	0.607	0.243	
Insulin (mUI/L)				
All	Entry	8.64 ± 0.85	11.37 ± 1.08	0.050
	Month 3	6.89 ± 0.42	9.76 ± 0.85	0.004
	<i>p</i> value ^c	0.007	0.020	
Men	Entry	8.76 ± 0.94	10.11 ± 1.38	ns
	Month 3	6.46 ± 0.49	9.48 ± 1.34	0.031
	<i>p</i> value ^c	0.005	0.529	
Women	Entry	8.55 ± 1.30	12.07 ± 1.49	ns
	Month 3	7.22 ± 0.64	9.90 ± 1.10	0.053
	<i>p</i> value ^c	0.147	0.015	

HOMA score				
All	Entry	2.10 ± 0.24	2.65 ± 0.28	ns
	Month 3	1.60 ± 0.11	2.20 ± 0.21	0.015
	<i>p</i> value ^c	0.013	0.019	
Men	Entry	2.11 ± 0.24	2.43 ± 0.33	ns
	Month 3	1.52 ± 0.13	2.21 ± 0.30	0.032
	<i>p</i> value ^c	0.005	0.457	
Women	Entry	2.09 ± 0.38	2.77 ± 0.40	ns
	Month 3	1.67 ± 0.17	2.19 ± 0.28	ns
	<i>p</i> value ^c	0.188	0.017	

^a Values are mean ± SEM

^b Comparison between extreme absorber groups (high and low-absorbers) at entry under Western-type diet (WD) (tested with GLM) and in their response to a low-saturated fat, low-cholesterol Mediterranean type-diet (LFLCD) (tested with repeated-measures GLM). ns: non significant ($p > 0.05$)

^c $p < 0.05$ for comparison between entry and 3-mo within groups (calculated by Student's t paired test).

^d Total population: high-absorbers n=41 and low-absorbers n=42.

^e High-absorber men: n=17; Low-absorber men: n=15.

^f High-absorber women: n=24; Low-absorber women: n=27.

Table 5 : Correlations between biochemical parameters and cholesterol homeostasis markers at entry^a

		Total Cholesterol	HDL-C	LDL-C	TRL-C	Insulin	HOMA	Triglycerides	TRL-TG
Lathosterol/ Campesterol^b	all	-0.083	-0.205 [*]	-0.153	0.289 ^{**}	0.190 [†]	0.154	0.145	0.315 ^{***}
	men	0.005	-0.247	-0.053	0.486 ^{***}	0.030	0.015	0.091	0.478 ^{***}
	women	-0.135	-0.202	-0.201	0.186	0.282 [†]	0.227	0.256 [*]	0.282 [*]
Lathosterol/ Cholestanol^b	all	-0.091	-0.232 ^{**}	-0.091	0.268 ^{**}	0.266 ^{**}	0.233 ^{**}	0.164	0.284 ^{**}
	men	-0.069	-0.175	-0.048	0.222	0.197	0.171	-0.048	0.206
	women	-0.065	-0.185	-0.099	0.286 [*]	0.311 ^{**}	0.266 [†]	0.340 ^{**}	0.359 ^{**}

^a Pearson correlation coefficient

^b mmol/mmol

*p < 0.05

**p < 0.01

***P ≤ 0.001

INTRODUCTION A L'ARTICLE N°2

De nombreux facteurs environnementaux et génétiques interviennent dans le métabolisme du cholestérol chez l'homme et se manifestent par une importante variation d'absorption du cholestérol allant de 29 à 80% chez des sujets sans pathologie (Bosner *et al.* 1999). Parmi l'étude des polymorphismes de gènes impliqués dans le processus d'absorption du cholestérol, nous nous sommes intéressés aux relations entre l'absorption et/ou la synthèse du cholestérol et le polymorphisme -493 G/T du gène de la Microsomal Triglyceride Transfer Protein ou MTP. Notre laboratoire a montré précédemment que ce polymorphisme était associé à la diminution du LDL-cholestérol après régime (Vincent-Baudry *et al.* 2005) et au sexe (Gastaldi *et al.* 2007). Le sexe étant un potentiel facteur de modulation de l'absorption du cholestérol, nous avons ciblé cette étude sur la population de femmes, qui dans cette cohorte présentaient un risque cardiovasculaire modéré. L'interaction possible entre le régime alimentaire et ce polymorphisme génétique était au centre de notre questionnement.

Ce SNP est en effet localisé dans le promoteur du gène *MTTP*, ce qui suggère que la modulation de l'expression de la MTP en fonction des génotypes puisse se répercuter sur l'assemblage des lipoprotéines et l'absorption du cholestérol, et finalement sur l'homéostasie du cholestérol.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons analysés les marqueurs plasmatiques d'absorption (cholestanol et sitostérol) et de synthèse (desmostérol and lathostérol) du cholestérol chez 69 femmes ($53,3 \pm 8,7$ ans) sous un régime de type occidental et après 3 mois de régime pauvre en matière grasse et en cholestérol, de type méditerranéen. Les génotypes du polymorphisme -493G/T de la MTP ont été déterminés par PCR.

ARTICLE 2

Cholesterol absorption status and fasting plasma cholesterol are modulated by the Microsomal Triacylglycerol Transfer Protein -493 G/T polymorphism and the usual diet in women

Estelle Wolff¹, Marie-France Vergnes¹, Catherine Defoort¹, Richard Planells¹, Henri Portugal^{1,2}, Alain Nicolay^{1,2}, Denis Lairon¹

RUNNING HEAD: MTP -493 G/T variants, diet and cholesterol in women

KEYWORDS : nutrition, intervention, *MTTP* gene, non-cholesterol sterols, Mediterranean-type diet, cardiovascular risk factor.

¹ INRA, UMR1260 “Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques”, INSERM, U476, Facultés de Médecine et de Pharmacie IPHM-IFR 125, 27 Boulevard Jean Moulin, Marseille, 13385 Cedex 05, France.

² Laboratoire de Biochimie-Hématologie Sud, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Corresponding author : Alain Nicolay, UMR 1260 INRA/476 INSERM, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France. Telephone: +33 491 83 56 97. Fax: +33 491 79 33 31 e-mail: alain.nicolay@univmed.fr

Article soumis à *Genes Nutr* , accepté le 15 mars 2010.

Abstract

Background: An important inter-individual variability in cholesterol absorption has been reported. It could result from polymorphisms in genes coding for proteins involved in the absorption process and in interaction with dietary intakes.

Objectives: To assess whether the extent of cholesterol absorption or synthesis is modified in adult women according to the -493 G/T polymorphism in the Microsomal Triglyceride Transfer Protein gene (*MTTP*) and/or the habitual diet.

Design: Cholestanol and sitosterol, as well as desmosterol and lathosterol, surrogate markers of cholesterol absorption or synthesis, respectively, were analysed in the fasting plasma of 69 middle-aged women under a Western type-diet (WD) and after 3-months on a low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD). Genotypes for *MTTP*-493G/T polymorphism were determined.

Results: Under an usual WD, subjects homozygous for the *MTTP*-493 T allele exhibited higher ($p < 0.05$) fasting serum concentrations of cholestanol (199.0 ± 30.0 vs $133 \pm 7.4 \times 10^2$ mmol/mol cholesterol) and lathosterol (188.7 ± 21.8 vs $147.6 \pm 9.1 \times 10^2$ mmol/mol cholesterol), as well as total cholesterol (7.37 ± 0.22 vs 6.63 ± 0.12 mmol/L) compared to G carrier subjects. After 3-months on a LFLCD, level of absorption markers decreased in TT subjects with no change in synthesis ones, leading to values comparable to those measured in G carriers. The lowering of plasma total and LDLcholesterol due to dietary change was 2.4 and 2.3 fold greater in TT women than in G carriers.

Conclusions:

The polymorphism -493G/T in *MTTP* modulates the level of cholesterol absorption but not synthesis in women under a WD, an effect abolished under a prudent LFLCD.

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) remains the leading cause of mortality in industrialized countries and is thus a major health outcome. Many epidemiological studies have indicated that the elevation in plasma cholesterol is a key and independent risk factor in the etiology of coronary heart disease [25]. The high incidence of CVD is partly ascribed to dietary habits [29] and more specifically, diets rich in saturated fat or cholesterol are known to increase concentrations of fasting plasma total cholesterol and LDL-cholesterol [30].

Along with de novo endogenous synthesis, intestinal cholesterol absorption regulates the body cholesterol homeostasis. While the mechanisms controlling cholesterol metabolism and levels have been widely investigated during the last decades [43], they do not yet explain the large inter-individual variability observed (30-80 %) in humans for the rate of cholesterol absorption by the small intestine [4, 38].

Cholesterol absorption is a complex multifactorial and polygenic process that is thought to result from an interaction between an individual's genetic background [43] and various environmental factors. Specifically, the efficiency of intestinal cholesterol absorption depends on dietary factors such as the dose of dietary cholesterol [28], the amount of dietary phytosterols [27] and the amount or type of dietary fat [32].

Regarding genetic factors, present knowledge is limited. Upon digestion, biliary and dietary cholesterol are stepwise absorbed by the small intestinal mucosa and re-secreted into chylomicrons reaching the circulation [1]. Several cellular trans-membrane transporters such as SR-B1, NPC1L1 and ABCG5/G8 have already been implicated in the process of cholesterol absorption by the small intestine [12], but their respective roles are still under investigation. Only few studies have documented the influence of allelic variants in genes coding for such transporters on the extent of cholesterol absorption [5, 8, 35].

In fact, many other intra-cellular proteins play key roles in cholesterol and lipid trafficking, packaging into chylomicrons and baso-lateral secretion [12]. The Microsomal triglyceride

Transfer Protein (MTP) is a heterodimeric lipid transfer protein mainly present in hepatocytes and enterocytes. MTP has an essential role in the assembly process and secretion of very low-density lipoproteins (VLDL) and chylomicrons into the plasma [39]. Indeed, it is able to transfer cholesterol esters [13] and triglycerides from the endoplasmic reticulum membranes to nascent apo-B lipoproteins [45]. For instance, the loss of activity resulting from mutations in the coding regions of the *MTTP* gene expresses the rare genetic disorder abetalipoproteinemia, with a suppressed chylomicron secretion and hypocholesterolemia [39, 44]. The *MTTP* gene is polymorphic, with several genetic variants especially in the promoter region [14, 17]. A number of studies were undertaken to demonstrate associations between this single nucleotide polymorphisms (SNP) at position -493 (G/T) in the promoter region of the *MTTP* and the concentration of circulating cholesterol, but provided inconsistent data [6, 7, 14, 19, 37, 40, 48]. The purpose of this study was to test for the first time the hypothesis of an association between the common *MTTP* -493 G/T polymorphism and the extent of cholesterol absorption or synthesis in humans, and its interaction with habitual diet. To that aim, we measured in 69 adult women surrogate markers of cholesterol absorption (cholestanol and sitosterol) and synthesis (desmosterol and lathosterol) [16, 23, 24], as well as plasma and lipoprotein cholesterol under two different dietary regimen, namely a Western diet (WD) or a low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD).

Subjects and methods

Subjects

The population and the dietary intervention have previously been described for the whole Medi-RIVAGE cohort [41, 42]. In the present study, the subgroup population was composed of 69 Caucasian women with moderate and untreated cardiovascular risk factors (Table 1). Briefly, women aged 28-70 were recruited at the Center for Detection and Prevention of Atherosclerosis at La Timone University Hospital (Marseille, France). They presented at least one of the

following eligibility criteria: fasting plasma cholesterol, 6.5-7.7 mmol/L; plasma triacylglycerols, 2.1-4.6 mmol/L; plasma glycemia, 6.1-6.9 mmol/L; systolic and diastolic blood pressure between 140-180 and 90-105 mm Hg, respectively; BMI > 27 kg/m²; smoking; sedentary lifestyle; family history of CVD. Hypolipidemic treatment was an exclusion criterion [42].

At entry, subjects (n=69) were used to follow a WD as published [42] and were advised to follow, for 3 months, a Mediterranean-type diet (n=35) or a low-fat type diet (n=34), both intended to reduce saturated fatty acids and cholesterol intakes. The compliance to dietary recommendations was checked by dieticians and 3-days food records were obtained at entry and after 3 months. The dietary records were analysed by dieticians using the GENI program (Micro6, Nancy, France) based on the French REGAL food database [41].

Analytical Methods

At entry and at the end of the 3 months (3-mo) intervention period, body mass index (BMI: kg/m²) was calculated and blood samples collected after an overnight fast. The triglyceride-rich lipoprotein (TRL) fraction (sf =20-400) was isolated by ultracentrifugation, as previously described [10]. Biochemical analyses were performed with commercial kits on fasting plasma samples as reported in details [42]. The sum of cholesterol carried out by apoB-containing lipoproteins (LDL- plus TRL-cholesterol) was calculated. Fasting serum non-cholesterol sterols (cholestanol, sitosterol, desmosterol and lathosterol) were quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) on a Hewlett-Packard 6890 GC-5973 MS apparatus, using the reference method of Miettinen et al. [23] using a Zebron-1 capillary column (50 m × 0.25 mm i.d., 0.50 µm film thickness). Epicoprostanol (0.2mL) was added to serum (0.2mL) as an internal standard. After alkaline hydrolysis, extraction and derivatization, non-cholesterol sterol concentrations were determined from the same GC-MS run. To eliminate the effect of changing

lipoprotein level, the non-cholesterol sterol values were standardized and expressed in terms of 102 mmol/mol cholesterol, as usual [21, 24].

Polymorphisms detection

Genomic DNA was prepared from white blood cells by a standard proteinase K-phenol method as reported [7]. The *MTTP* - 493G/T polymorphisms (rs 1800591, chromosome 4, contig NT 016354.18 position 25043208) were genotyped by a polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism assay, the restriction cleavage being performed by HphI enzyme [14].

Primers used for PCR were: forward 5' AGTTTCACACATAAGGACAATCATCTA-3' and reverse 5' GGATTTAAATTTAAACTGTTAATTCATATCAC-3'(mutated).

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted with SPSS software (v17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Hardy-Weinberg equilibrium between genotypes of MTP-493G/T was assessed by a chi square – test. All data are expressed as means \pm SEMs.

Prior to analysis, the distribution of each outcome variable was checked for normality and logarithmic transformations were performed on individual values of plasma and Framingham score.

Statistical significances between Mediterranean type-diet and low fat type-diet sub-groups were tested with univariate general linear models on plasma cholesterol parameters and serum non-cholesterol sterols (data not shown). These 2 sub-groups of women did not differ according to the followed diet, in agreement with observations previously reported for the whole mixed cohort [41]. The 2 sub-groups could thus be merged for the present analysis as done before [7].

Before testing the effect of genotypes on the dependent variables, Pearson correlation coefficients were calculated to check interrelations between absorption and synthesis markers of cholesterol.

Age, BMI, alcohol consumption, smoking status and menopausal status were identified as interfering covariables and used as adjustment factors (tested by univariate general linear models at entry). The effects of the genotypes at entry, 3-mo and on the response to the diet were tested with general linear models. Intragroup comparison between entry and 3-mo data was performed with Student's *t* paired test or non parametric Wilcoxon test, as indicated. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

In the women sample studied (*n* = 69), the frequency of MTPP 493G/T genotypes was 0.43 for GG, 0.43 for GT and 0.13 for TT. The distribution of genotypes was not significantly different from that expected under the Hardy-Weinberg equilibrium (*p* = 0.729).

At entry (Table 1), women fasting plasma cholesterol ranged 4.26 to 9.54 mmol/L, 58% women having hypercholesterolemia (cholesterol > 6.5 mmol/L). Moreover, 62% women had a BMI above 25, 25% had a systolic blood pressure higher than 140 mm Hg, 19% had triglyceridemia >1.7 mmol/L and 7% had hyperglycemia (glucose > 6 mmol/L).

As shown in Table 2, BMI, weight and energy intake (kJ) were not different between genotypes. Moreover, protein, carbohydrate and fat (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) intakes were comparable at entry and after 3-mo intervention whatever the genotype. The 3-mo dietary intervention with LFLCD clearly resulted in significant changes in nutrient intakes, especially in reduction of saturated fat and cholesterol intakes (*p* < 0.05) independently of the allele present.

At entry under a Western diet, cholestanol and sitosterol plasma levels gradually increased from homozygous GG towards homozygous TT (Table 3). The comparison of homozygous TT with G carriers (grouping GT and GG alleles) showed higher plasma levels of cholestanol and sitosterol, along with a moderately higher level of lathosterol but not desmosterol (Table 4).

The levels of the various cholesterol parameters measured at entry were not different between genotype groups except for a trend to higher plasma cholesterol in subjects having the T allele (Table 3). In contrast, women homozygous for T allele exhibited higher values for plasma cholesterol, TRL-cholesterol and ApoB-containing lipoprotein cholesterol than the G carriers at entry (Table 4). Comparable HDL-cholesterol, TRL-Triglycerides and ApoB levels were observed in TT or G carriers.

After the 3-mo dietary intervention with LFLCD, the levels of all synthesis and absorption markers were no longer significantly different between G carriers and TT women (Table 4) although values for cholestanol, sitosterol and lathosterol remained marginally higher. No differences were found between genotypes for other lipid or cholesterol or ApoB levels.

However, the effect of LFLCD appeared different according to genotypes. Indeed, TT women, but not G carrier women, showed a decrease in cholestanol and sitosterol levels ($p= 0.045$ and $p= 0.035$ adjusted to age and menopausal status; $p=0.057$ and $p= 0.043$ adjusted to age, menopausal status and BMI, respectively) (Table 4). This reduction in cholesterol absorption markers was not balanced by a noticeable elevation of desmosterol or lathosterol levels. Finally, only TT women showed a significant reduction in TRL-cholesterol level after 3-mo on the LFLCD.

Discussion

The results of the present study show, for the first time in adult women, an association of the 493G/T polymorphism in *MTTP* gene with cholesterol absorption markers, as well as the metabolic response to a dietary challenge. This association is modulated by the chronic diet of the subjects in such a way that it is observed only under a Western-type diet (WD) and not a low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD).

As in numerous previous studies, we measured herein serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol metabolism [16, 20, 23, 24]. Cholestanol and sitosterol well reflect the

extent of intestinal cholesterol absorption whereas lathosterol and desmosterol are precursors and markers of endogenous cholesterol synthesis. It is noteworthy that we found in the present study (data not shown) as expected that the two cholesterol absorption markers were positively correlated and that they were both negatively correlated with synthesis markers, reflecting the well-known cholesterol homeostasis regulation [24].

It has been shown using a stable isotope method that the rate of cholesterol absorption is not different in women and men [4]. Nevertheless, some previous studies showed a sex-specific association between *MTTP* polymorphisms and anthropometric, blood and lipid parameters [3, 47, 48]. Moreover, the effects of a dietary challenge can be differently modulated by *MTTP* genotypes according to sex. For instance, previous results from our laboratory showed that insulinemia and Framingham score displayed a genotype by sex interaction for the -493 locus in *MTTP* gene during this 3-mo dietary intervention [7]. This therefore highlights the importance of considering genders separately in such gene-diet interaction studies.

Our first finding was the association of the -493G/T polymorphism in *MTTP* gene with cholesterol absorption markers, but not synthesis ones, in adult women under a Western-type diet (WD). As we did not find differences in the dietary intakes of subjects according to the gene locus at entry under the WD, this observation supports the existence of a clear effect of the polymorphism at -493 *MTTP* gene locus on the cholesterol absorption process in this cholesterol- and saturated fat-rich dietary context. Indeed, the T allele is associated with an increased cholesterol absorption status with TT homozygotes having a significantly higher level of surrogate markers (+ 49.6% and + 139.4 % for cholestanol and sitosterol, respectively) compared to G carriers. In contrast, this locus does not seem to be noticeably associated with the extent of cholesterol synthesis. It was very interesting to observe that, under the WD, TT homozygote women showed higher fasting levels for plasma cholesterol, TRL-cholesterol and ApoB-containing lipoprotein cholesterol, illustrating the clear relationship existing between the augmented extent of intestinal cholesterol absorption and the increased levels of circulating

lipoproteins carrying cholesterol derived from the small intestine, and also the liver. This is in line with previous data reporting an association of LDL cholesterol with cholesterol absorption level [20, 22, 31, 38]. It is noteworthy that fasting HDL cholesterol and TG levels were not affected by this gene locus suggesting that it predominantly interacts with the intestinal processing of cholesterol in a WD context.

Our second finding highlighted the modulatory effect of the -493G/T *MTTP* polymorphism on the cholesterol absorption status and the metabolic response of women to a low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD) 3-mo challenge. As for entry, no differences in the subject's dietary intakes according to the locus were observed after the 3-mo intervention period but the response to LFLCD differed between homozygous TT and G carriers. The key observation was that the LFLCD resulted in a significant reduction in both cholesterol absorption markers in TT women (- 12.9 and - 17.4 % for cholestanol and sitosterol, respectively) whereas not noticeable change was observed in G carriers. This contrasted response abolished the significant difference in absorption status as observed between TT and G carriers under the WD. This indicates that under a LFLCD, the -493G/T *MTTP* polymorphism does not modulate the cholesterol absorption phenotype as observed under the WD. This points out that while a diet rich in saturated fat and cholesterol promotes a high-absorption status in TT women, a low-saturated fat, low-cholesterol diet does not, illustrating a strong gene-diet interaction. In contrast, the endogenous cholesterol synthesis markers were not altered by the 3-mo dietary challenge while the homozygote TT women showed an inconsistent change with comparable desmosterol and increased lathosterol levels compared with G carriers. This modest rise can likely be explained as the result of a compensatory mechanism somewhat increasing cholesterol synthesis when cholesterol absorption decreased as reported [22].

The decrease observed in cholesterol absorption status in TT women after the LFLCD was accompanied by a 26.3 % lowering of TRL-cholesterol levels which are the primary circulating cholesterol carriers derived from both the small intestine (chylomicrons) and the liver (VLDL).

This well supports the concept that the T allele at -493 *MTTP* gene locus could favour the packaging of cholesterol into TRL particles.

Overall, the low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD) promoted a lower cholesterol absorption status which can explain, at least partly, the observed beneficial reductions in total, TRL-cholesterol and ApoB-containing lipoprotein cholesterol. In contrast, it has recently been reported that a restricted weight-loss diet led to a reduction of cholesterol synthesis without changes in absorption capacity in women [34]. Moreover, variations in intakes of dietary fat or cholesterol were not accompanied by noticeable changes in cholesterol absorption markers in a short-term study in men [26].

The mechanisms behind the observed effects of the -493G/T *MTTP* polymorphism deserve more specific comments. In fact, some other studies have highlighted that polymorphisms in *MTTP* gene can alter various health-related indexes such as circulating cholesterol [2, 14, 17, 19] and insulinemia [7]. Both functional genetic variant in the *MTTP* gene and diet are likely to alter the expression and intracellular concentration of MTP and subsequently, the amount of assembled chylomicrons in the small intestine. The lower level of cholesterol absorption in G carrier vs TT women could likely result from the two fold lower activity of the *MTTP* gene promoter bearing the G allele vs T as found in vitro [14]. It has also been reported that the activity of the *MTTP* gene promoter could also be modulated by the -164T>C polymorphism [33] which was not studied herein. On the other hand, the *MTTP* gene is up-regulated by cholesterol [9] and down regulated by insulin [18] and the transcription factor SREBP1[9, 36]. We can thus suggest that a higher intake of dietary cholesterol, as occurring under the Western diet (WD) period, could enhance the expression of *MTTP* in human intestinal cells and hypothesize that this could preferentially occur in the presence of the T allele in the - 493 locus of the *MTTP* gene promoter. When changing for a low-cholesterol type-diet as herein, homozygous TT women would more markedly than G carriers lower the intracellular *MTTP* gene transcription through lowering of cholesterol intake and decreasing insulinemia, resulting in lower MTP expression,

and finally lower cholesterol uptake and chylomicron assembly. Further studies should aim to validate this hypothesis.

The present data raise questions in terms of public health nutrition and cardiovascular risk. It has largely been described that upon controlled dietary interventions dedicated to lower plasma or LDL cholesterol, part of subjects showed a marked response while others did not exhibit any change [5, 11, 15, 49], thus highly suggesting an important gene-diet interaction. According to other authors, the minor variant -493T allele in *MTTP* promoter has been associated with lower serum LDL cholesterol [2, 14, 17, 19] but not in all studies [37, 48]. Finally, a higher cholesterol absorption level in subjects with elevated risk of CHD [31] [20] has recently been reported. Taken together, these data and our present findings support the concept of a strong link between usual diet, gene polymorphisms, ApoB-containing lipoprotein cholesterol and CHD risk. Large scale intervention studies are needed to confirm our findings owing to the low frequency of minor allelic variants and possible sex-specific associations. Nevertheless, the present observation that 13% women at moderate cardiovascular risk are TT homozygote for the -493G/T *MTTP* polymorphism and have a high-absorber cholesterol status under a unbalanced diet raises the need for more targeted dietary recommendations in the perspective of personalized nutrition based on nutrigenetics [46].

Acknowledgments

Supported by the French Research Minister (AQS grant), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (IDS grant), the Provence-Alpes-Côte d'Azur Regional Council, the Bouches du Rhône General Council and the Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologies-Provence-Alpes-Côte d'Azur.

The authors thank MC Bernard, M. Gerber and P. Vague for their active role during the intervention study, Julien Mancini for his statistical help as well as Chantal Bideau, Danielle Iniesta and Nicole Peyrol for their technical skill in SNP determination.

E Wolff, MF Vergnes, C Defoort, R Planells, H Portugal, A Nicolay and D Lairon : no conflicts of interest.

References

1. Beaumier-Gallon G, Dubois C, Senft M, Vergnes MF, Pauli AM, Portugal H, Lairon D (2001) Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 73: 870-877
2. Bjorn L, Leren TP, Ose L, Hamsten A, Karpe F (2000) A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP -493G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1784-1788
3. Bohme M, Grallert H, Fischer A, Gieger C, Nitz I, Heid I, Kohl C, Wichmann HE, Illig T, Doring F (2008) MTP variants and body mass index, waist circumference and serum cholesterol level: Association analyses in 7582 participants of the KORA study cohort. *Mol Genet Metab* 95: 229-232
4. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE, Jr. (1999) Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 40: 302-308
5. Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, Esmail S, Vega GL, Grundy SM, Hobbs HH (2006) Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1810-1815
6. Couture P, Otvos JD, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM (2000) Absence of association between genetic variation in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein gene and plasma lipoproteins in the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* 148: 337-343

7. Gastaldi M, Diziere S, Defoort C, Portugal H, Lairon D, Darmon M, Planells R (2007) Sex-specific association of fatty acid binding protein 2 and microsomal triacylglycerol transfer protein variants with response to dietary lipid changes in the 3-mo Medi-RIVAGE primary intervention study. *Am J Clin Nutr* 86: 1633-1641
8. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R, Miettinen TA (2004) Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 45: 1660-1665
9. Hagan DL, Kienzle B, Jamil H, Hariharan N (1994) Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem* 269: 28737-28744
10. Harbis A, Defoort C, Narbonne H, Juhel C, Senft M, Latge C, Delenne B, Portugal H, Atlan-Gepner C, Vialettes B et al. (2001) Acute hyperinsulinism modulates plasma apolipoprotein B-48 triglyceride-rich lipoproteins in healthy subjects during the postprandial period. *Diabetes* 50: 462-469
11. Herron KL, McGrane MM, Waters D, Lofgren IE, Clark RM, Ordovas JM, Fernandez ML (2006) The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs. *J Nutr* 136: 1161-1165
12. Iqbal J, Hussain MM (2009) Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1183-1194
13. Iqbal J, Rudel LL, Hussain MM (2008) Microsomal triglyceride transfer protein enhances cellular cholesteryl esterification by relieving product inhibition. *J Biol Chem* 283: 19967-19980
14. Karpe F, Lundahl B, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A (1998) A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 756-761
15. Katan MB, Beynen AC (1987) Characteristics of human hypo- and hyperresponders to dietary cholesterol. *Am J Epidemiol* 125: 387-399

16. Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB (1988) Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res* 29: 1149-1155
17. Ledmyr H, Karpe F, Lundahl B, McKinnon M, Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E (2002) Variants of the microsomal triglyceride transfer protein gene are associated with plasma cholesterol levels and body mass index. *J Lipid Res* 43: 51-58
18. Lin MC, Gordon D, Wetterau JR (1995) Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res* 36: 1073-1081
19. Lundahl B, Skoglund-Andersson C, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Hamsten A, Packard CJ, Karpe F (2006) Microsomal triglyceride transfer protein -493T variant reduces IDL plus LDL apoB production and the plasma concentration of large LDL particles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E739-745
20. Matthan NR, Pencina M, Larocque JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH (2009) Alterations in cholesterol absorption and synthesis characterize Framingham offspring study participants with coronary heart disease. *J Lipid Res* 50: 1927-1935
21. Miettinen TA (1982) Diurnal variation of cholesterol precursors squalene and methyl sterols in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 23: 466-473
22. Miettinen TA, Kesaniemi YA (1989) Cholesterol absorption: regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels. *Am J Clin Nutr* 49: 629-635
23. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1989) Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism* 38: 136-140
24. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1990) Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 131: 20-31

25. NCEP (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 106: 3143-3421
26. Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA (2008) Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr* 99: 370-378
27. Ostlund RE, Jr. (2007) Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* 42: 41-45
28. Ostlund RE, Jr., Bosner MS, Stenson WF (1999) Cholesterol absorption efficiency declines at moderate dietary doses in normal human subjects. *J Lipid Res* 40: 1453-1458
29. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Vlismas K, Skoumas Y, Palliou K, Stefanadis C (2008) Dietary habits mediate the relationship between socio-economic status and CVD factors among healthy adults: the ATTICA study. *Public Health Nutr* 11: 1342-1349
30. Puska P (2009) Fat and heart disease: yes we can make a change--the case of North Karelia (Finland). *Ann Nutr Metab* 54 Suppl 1: 33-38
31. Rajaratnam RA, Gylling H, Miettinen TA (2000) Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 35: 1185-1191
32. Ros E (2000) Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 151: 357-379
33. Rubin D, Schneider-Muntau A, Klapper M, Nitz I, Helwig U, Folsch UR, Schrezenmeir J, Doring F (2008) Functional analysis of promoter variants in the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene. *Hum Mutat* 29: 123-129
34. Santosa S, Demonty I, Lichtenstein AH, Jones PJ (2007) Cholesterol metabolism and body composition in women: the effects of moderate weight loss. *Int J Obes (Lond)* 31: 933-941

35. Santosa S, Demonty I, Lichtenstein AH, Ordovas JM, Jones PJ (2007) Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 are associated with changes in cholesterol metabolism during weight loss. *J Lipid Res* 48: 2607-2613
36. Sato R, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T, Maeda M (1999) Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem* 274: 24714-24720
37. Schgoer W, Eller P, Mueller T, Tancevski I, Wehinger A, Ulmer H, Sandhofer A, Ritsch A, Haltmayer M, Patsch JR (2008) The MTP -493TT genotype is associated with peripheral arterial disease: results from the Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) Study. *Clin Biochem* 41: 712-716
38. Sehayek E, Nath C, Heinemann T, McGee M, Seidman CE, Samuel P, Breslow JL (1998) U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res* 39: 2415-2422
39. Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ (1993) Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365: 65-69
40. Stan S, Lambert M, Delvin E, Paradis G, O'Loughlin J, Hanley JA, Levy E (2005) Intestinal fatty acid binding protein and microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms in French-Canadian youth. *J Lipid Res* 46: 320-327
41. Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolier P, Amiot-Carlin MJ et al. (2005) The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr* 82: 964-971
42. Vincent S, Gerber M, Bernard MC, Defoort C, Loundou A, Portugal H, Planells R, Juhan-Vague I, Charpiot P, Grolier P et al. (2004) The Medi-RIVAGE study (Mediterranean

- Diet, Cardiovascular Risks and Gene Polymorphisms): rationale, recruitment, design, dietary intervention and baseline characteristics of participants. *Public Health Nutr* 7: 531-542
43. Wang DQ (2007) Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* 69: 221-248
44. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258: 999-1001
45. Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN, Joiner BJ (1990) Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem* 265: 9800-9807
46. Williams CM, Ordovas JM, Lairon D, Hesketh J, Lietz G, Gibney M, van Ommen B (2008) The challenges for molecular nutrition research 1: linking genotype to healthy nutrition. *Genes Nutr* 3: 41-49
47. Yamada Y, Ando F, Shimokata H (2006) Association of a microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism with blood pressure in Japanese women. *Int J Mol Med* 17: 83-88
48. Zak A, Jachymova M, Tvrzicka E, Vecka M, Duffkova L, Zeman M, Slaby A, Stankova B (2008) The influence of polymorphism of -493G/T MTP gene promoter and metabolic syndrome on lipids, fatty acids and oxidative stress. *J Nutr Biochem* 19: 634-641
49. Zhao HL, Houweling AH, Vanstone CA, Jew S, Trautwein EA, Duchateau GS, Jones PJ (2008) Genetic variation in ABC G5/G8 and NPC1L1 impact cholesterol response to plant sterols in hypercholesterolemic men. *Lipids* 43: 1155-1164

Table 1: Characteristics of subjects enrolled at entry and after 3-month dietary intervention^a

Women n=69		<i>p</i> value ^b
Age <i>years</i>	53.3 ± 1.0	
Menopausal status (0/1) ^c	41 / 28	
Activity 1/2/3 ^d	41 / 17 / 11	
Current smokers 0/1/2 ^e	43 / 15 / 9	
Weight <i>kg</i>		
Entry	70.8 ± 1.5	<0.001
Month 3	67.7 ± 1.4	
Body Mass Index <i>kg/m²</i>		
Entry	28.1 ± 0.6	<0.001
Month 3	26.9 ± 0.5	
Systolic Blood Pressure <i>mm Hg</i>		
Entry	125.8 ± 2.3	ns
Month 3	124.6 ± 1.5	
Diastolic Blood Pressure <i>mm Hg</i>		
Entry	76.1 ± 1.2	0.069
Month 3	77.8 ± 0.9	
Total cholesterol <i>mmol/L</i>		
Entry	6.73 ± 0.11	0.001
Month 3	6.40 ± 0.11	
LDL cholesterol <i>mmol/L</i>		
Entry	4.33 ± 0.11	0.030
Month 3	4.12 ± 0.09	
Triglycerides <i>mmol/L</i>		
Entry	1.38 ± 0.09	0.087
Month 3	1.24 ± 0.06	
Insulin <i>μU/mL</i>		
Entry	10.03 ± 0.78	<0.001
Month 3	8.23 ± 0.56	
Glucose <i>mmol/L</i>		
Entry	5.16 ± 0.07	0.002
Month 3	4.96 ± 0.06	
Framingham score		
Entry	6.3 ± 0.4	0.001
Month 3	5.6 ± 0.4	

^a Values are mean ± SEM

^b Comparison between subjects at entry (Western diet, WD) and after 3-mo intervention (low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet, LFLCD) tested with Student t paired test.

^c 0 : no menopausal or treated women / 1: menopausal women

^d 1: activity/ 2:retirement/ 3: inactivity

^e 0: never smoker / 1: smoker / 2: former smoker

Table 2 : Dietary intakes of subjects according to *MTTP*-493G/T polymorphism^a

	G/G	G/T	T/T	<i>p</i> value ^b
69 women	n=30	n=30	n=9	
Total energy <i>kJ</i>				
Entry	7237.6 ± 288.3	7117.0 ± 310.9	7929.4 ± 825.8	ns
Month 3	5285.4 ± 226.6	5279.8 ± 175.9	5640.8 ± 281.2	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	0.011	
Protein <i>g/d</i>				
Entry	79.5 ± 2.6	73.9 ± 3.1	83.1 ± 7.4	ns
Month 3	61.1 ± 1.7	63.6 ± 2.7	69.4 ± 4.3	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	0.011	0.021	
Carbohydrate <i>g/d</i>				
Entry	173.4 ± 8.3	181.4 ± 9.9	214.3 ± 19.8	ns
Month 3	141.0 ± 6.8	145.5 ± 6.3	155.1 ± 10.6	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	0.008	
Total fat <i>g/d</i>				
Entry	75.7 ± 4.1	73.5 ± 4.4	77.0 ± 13.6	ns
Month 3	48.4 ± 3.1	45.3 ± 2.1	49.0 ± 3.3	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	0.038	
SFA <i>g/d</i>^d				
Entry	27.2 ± 1.7	27.8 ± 2.2	28.6 ± 5.1	ns
Month 3	14.2 ± 0.9	13.8 ± 1.1	13.9 ± 1.6	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	0.008	
MUFA <i>g/d</i>^e				
Entry	28.2 ± 1.7	26.9 ± 1.8	29.5 ± 5.4	ns
Month 3	19.9 ± 1.4	18.3 ± 0.9	19.8 ± 1.3	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	0.051	
PUFA <i>g/d</i>^f				
Entry	11.7 ± 0.9	9.4 ± 0.8	8.7 ± 1.7	ns
Month 3	8.9 ± 0.9	7.7 ± 0.6	9.1 ± 1.3	ns
<i>p</i> value ^c	0.029	0.074	0.767	
Cholesterol <i>mg/d</i>				
Entry	293.4 ± 17.4	276.7 ± 18.3	282.6 ± 33.3	ns
Month 3	145.9 ± 9.7	171.1 ± 15.9	141.7 ± 16.2	ns
<i>p</i> value ^c	<0.001	<0.001	0.008	

^a Values are mean ± SEM^b Comparison between genotypes at entry with Western-type diet (WD) and in their response to low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD) tested with general linear models. ns: non significant ($p \geq 0.05$)

^c $p < 0.05$ for comparison between entry and 3-mo within groups (calculated by Student's t paired test for G/G and G/T and by Wilcoxon test for T/T).

^d SFA, saturated fatty acids (g/day)

^e MUFA, monounsaturated fatty acids (g/day)

^f PUFA, polyunsaturated fatty acids (g/day)

Table 3: Subjects fasting biochemical parameters according to *MTTP*-493 G/T polymorphism at entry on a Western diet (WD)^a

	G/G (n=30)	G/T (n=30)	T/T (n=9)	<i>P</i> value ^b
Cholestanol ^c	129.6 ± 9.8	136.4 ± 11.3	199.0 ± 30.0	0.034
Sitosterol ^c	103.8 ± 12.5	114.1 ± 15.5	261.1 ± 104.7	0.037
Desmosterol ^c	114.2 ± 6.9	106.1 ± 5.7	109.2 ± 4.2	ns
Lathosterol ^c	152.8 ± 15.2	142.3 ± 10.3	188.7 ± 21.8	0.081
Cholesterol <i>mmol/L</i>	6.62 ± 0.14	6.64 ± 0.19	7.37 ± 0.22	0.106
HDL cholesterol <i>mmol/L</i>	1.68 ± 0.09	1.65 ± 0.09	1.65 ± 0.19	ns
LDL cholesterol <i>mmol/L</i>	4.26 ± 0.17	4.25 ± 0.19	4.81 ± 0.22	ns
TRL cholesterol <i>mmol/L</i>	0.92 ± 0.12	0.98 ± 0.11	1.37 ± 0.31	ns
ApoB-cholesterol ^d <i>mmol/L</i>	5.18 ± 0.22	5.15 ± 0.24	6.07 ± 0.47	ns
TRL TG <i>mmol/L</i>	0.87 ± 0.11	0.85 ± 0.11	0.86 ± 0.17	ns
TRL PL <i>mmol/L</i>	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.33 ± 0.06	ns
ApoB <i>g/L</i>	1.22 ± 0.05	1.33 ± 0.03	1.21 ± 0.09	ns
Insulin μ U/mL	11.23 ± 1.29	9.21 ± 1.15	8.78 ± 1.66	ns

^a Values are mean ± SEM.

^b Comparison between genotypes at entry tested with general linear models and adjusted for age, menopausal status and BMI. ns: non significant ($p \geq 0.05$)

^c 10² mmol/mol cholesterol

^d ApoB-cholesterol is the calculated sum of apoB-containing LDL- and TRL-cholesterol levels.

Table 4: Fasting biochemical parameters under a Western-type diet (WD) at entry and after a 3-mo low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD) according to *MTTP*-493G/T polymorphism^a

69 women	G/G+G/T n=60	T/T n=9	<i>p</i> value ^b
Cholestanol^c			
Entry	133.0 ± 7.4	199.0 ± 30.0	0.002
Month 3	143.3 ± 7.8	173.5 ± 20.1	ns
Mean change	9.98 ± 6.14	-25.59 ± 24.21	0.045
Sitosterol^c			
Entry	109.0 ± 9.9	261.1 ± 104.7	0.002
Month 3	133.9 ± 11.9	215.7 ± 80.0	0.081
Mean change	23.67 ± 11.08	-45.37 ± 43.37	0.035
Desmosterol^c			
Entry	110.1 ± 4.5	109.2 ± 4.2	ns
Month 3	107.7 ± 4.4	102.5 ± 6.2	ns
Mean change	-3.81 ± 4.00	-6.64 ± 6.86	ns
Lathosterol^c			
Entry	147.6 ± 9.1	188.7 ± 21.8	0.101
Month 3	144.8 ± 10.7	195.5 ± 22.0	0.032
Mean change	-4.42 ± 8.89	6.77 ± 12.80	ns
Cholesterol mmol/L			
Entry	6.63 ± 0.12	7.37 ± 0.22	0.023
Month 3	6.35 ± 0.12*	6.70 ± 0.21*	ns
Mean change	-0.277 ± 0.096	-0.663 ± 0.267	ns
HDL cholesterol mmol/L			
Entry	1.66 ± 0.06	1.65 ± 0.19	ns
Month 3	1.66 ± 0.08	1.63 ± 0.23	ns
Mean change	-0.004 ± 0.046	-0.013 ± 0.093	ns
LDL cholesterol mmol/L			
Entry	4.25 ± 0.13	4.81 ± 0.22	0.107
Month 3	4.08 ± 0.10	4.41 ± 0.18*	0.130
Mean change	-0.177 ± 0.104	-0.403 ± 0.164	ns
TRL cholesterol mmol/L			
Entry	0.95 ± 0.08	1.37 ± 0.31	0.091
Month 3	0.93 ± 0.08	0.88 ± 0.17	ns
Mean change	-0.017 ± 0.078	-0.493 ± 0.294	0.050
ApoB-cholesterol^d mmol/L			
Entry	5.16 ± 0.16	6.07 ± 0.47	0.056
Month 3	5.07 ± 1.08	5.42 ± 0.98	ns
Mean change	-0.14 ± 0.13	-0.90 ± 0.40	0.049
Triglycerides mmol/L			
Entry	1.592 ± 0.088	1.623 ± 0.321	ns
Month 3	1.453 ± 0.081	1.199 ± 0.173	ns
Mean change	-0.137 ± 0.064	-0.424 ± 0.370	ns
TRL TG mmol/L			
Entry	0.86 ± 0.08	0.85 ± 0.17	ns
Month 3	0.81 ± 0.07	0.78 ± 0.18	ns
Mean change	-0.023 ± 0.067	-0.071 ± 0.094	ns

ApoB mmol/L			
Entry	1.27 ± 0.03	1.21 ± 0.09	ns
Month 3	1.21 ± 0.03*	1.21 ± 0.10	ns
Mean change	-0.065 ± 0.026	-0.041 ± 0.047	ns
Insulin μU/mL			
Entry	10.22 ± 0.87	8.78 ± 1.66	ns
Month 3	8.33 ± 0.56*	7.41 ± 2.02	ns
Mean change	-2.04 ± 0.54	-1.21 ± 1.14	ns

^a Values are mean ± SEM.

Mean changes are calculated as 3-mo value minus entry value.

^b Comparison between genotypes at entry with Western-type diet (WD) and in their response to low-saturated fat, low-cholesterol/Mediterranean type-diet (LFLCD) tested with general linear models and adjusted for age, menopausal status and BMI. ns: non significant ($p \geq 0.05$)

^c 10^2 mmol/mol cholesterol

^d ApoB-cholesterol is the calculated sum of apoB-containing LDL- and TRL-cholesterol levels.

* $p < 0.05$ for comparison between entry and 3-mo (calculated by Student's t paired test for G/G and G/T and by Wilcoxon test for T/T).

INTRODUCTION A L'ARTICLE N°3

Pour l'étude d'intervention MEDI-Rivage, nous avons utilisé la méthode de dosage indirecte qui s'applique plus aisément à de grandes cohortes. Nous avons pu ainsi étudier les niveaux d'absorption et de synthèse du cholestérol après intervention nutritionnelle dans une population mixte, relativement hétérogène, présentant au moins un facteur de risque de MCV. Bien qu'elle prenne en compte l'homéostasie du cholestérol, cette méthode de dosage ne permet pas de quantifier la relation entre cholestérol alimentaire et cholestérol plasmatique. Seule la méthode de dosage directe permet de mesurer le taux d'absorption du cholestérol exogène.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est la technique d'analyse de référence utilisée dans le dosage du cholestérol stable (Bosner *et al.* 1993). Bien que l'IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) (Binnert *et al.* 1995) et l'ionisation chimique négative (Bosner *et al.* 1999) soient plus sensibles que la spectrométrie de masse par impact électronique, nous avons choisi cette méthode de dosage qui, au demeurant, est très performante pour détecter les traces de nos deux marqueurs du cholestérol, le D4- et le D7-cholestérol. Lors de la mise au point de la méthode directe, nous avons constaté que le D4-cholestérol (ou le D7-cholestérol) dosé en solution seul ne donnait pas le même signal en présence de cholestérol naturel. Cette différence de signal n'étant pas proportionnelle à la concentration en D4-cholestérol (ou D7-cholestérol), nous avons assimilé ce problème à un « effet matrice », ce que viendra confirmer l'étude de l'influence du cholestérol naturel sur le D4 et D7-cholestérol.

Par ailleurs, la faible différence de masse entre cholestérol naturel et D4/D7-cholestérol est à l'origine d'interférences analytiques qui ont également été étudiées.

Qu'ils s'agissent de l'effet matrice ou des interférences liées aux masses, des corrections doivent être appliquées, afin de déterminer les concentrations réelles de D4-cholestérol et de D7-cholestérol. Cette mise au point analytique est détaillée dans ce 3^{ème} article.

ARTICLE 3

A new approach to overcome natural cholesterol interference during simultaneous determination of two stable isotope-enriched cholesterol tracers in human plasma.

E Wolff^{a,c}, MF Vergnes^{a,c}, J Kaloustian^{a,c}, L Abou^c, C Mikail^c, D Lairon^{a,b}, H Portugal^{a,c}, A Nicolay^{a,c}.

^aUniv Méditerranée Aix-Marseille 2, Marseille, F-13385 France ; INSERM, U476 «Nutrition Humaine et lipides», Marseille, F-13385 France ; INRA, UMR1260, Marseille, F-13385 France ; IPHM, Marseille, F-13385 France

^bFaculté de Médecine, 27, boulevard Jean Moulin, Marseille, F-13385 cedex 05, France

^cLaboratoire de Chimie Analytique, Qualitologie, Nutrition, Faculté de Pharmacie, 27, boulevard Jean Moulin, Marseille, F-13385 cedex 05, France ;

Corresponding author : alain.nicolay@univmed.fr

Article publié dans : *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(19):3175-9.

Abstract

We have developed a validated gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) method with two labelled cholesterol tracers, i.e. $^2\text{H}_4$ ([2H_4]-Chol) and $^2\text{H}_7$ ([2H_7]-Chol) enriched moities with a new way of calculating the abundance of labelled cholesterol in plasma without natural cholesterol interference. The isotopomers of the analytes could interfere during analysis. Elimination of these interferences can be performed by blank or mathematical subtraction method.

Validation was performed with the two interference elimination methods. For both method, linearity was obtained in the range $5 \cdot 10^{-4}$ to 10^{-2} mM for both labelled cholesterol moities. In the same range, repeatability and reproducibility were less than 6.5% and 7.5 % for [2H_4]-Chol and [2H_7]-Chol, respectively. Accuracy was about 100% and recoveries always include 100% for the two labelled cholesterols.

We demonstrate that measurement of blank plasma is not necessary when using the validated abundance isotope calculation method. This saves time, reagent and samples. This calculation strategy can be extrapolated to comparable tracer approaches.

1. Introduction

Hypercholesterolemia is a major health risk factor especially for cardiovascular disease. It is known that dietary cholesterol absorption is an important factor affecting plasma and tissue cholesterol levels. Measurement of cholesterol absorption gives important information on the relationship between diet and plasma cholesterol. Considerable effort has thus been devoted to the development of reliable *in vivo* clinical methods to measure cholesterol absorption in humans¹⁻⁹.

Early absorption investigation methods used radiolabeled isotopes ([³H], [¹⁴C])^{1-8, 10-13} but these are preferentially used in animals nowadays. In humans, there are two possible approaches, one using stable isotopes¹⁴⁻²⁸, the other one measuring plasma sterol markers²⁹⁻³⁴. To investigate cholesterol absorption with stable isotope ([²H], [¹³C], [¹⁸O]), the reference standard method uses simultaneously oral and intravenous labelled cholesterol.

With the Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) method, Bosner and co-workers^{15, 16, 22} and Pouteau *et al.*³⁵ used labelled cholesterol with [¹³C5] and [²H6] or [²H6] and [²H5]. In the latter case, negative chemical ionisation was used. Jones²³ used [¹³C5] and [²H7] while Gremaud *et al.*^{24, 36} employed [¹³C] and [¹⁸O]. In all cases, two labelled cholesterol molecules with a difference of 1 or 2 m/z were measured in plasma. However, it is known that natural cholesterol present in the body provides m+1/z to m+7/z isotopomers. Some studies take these natural cholesterol isotopomers^{15, 16, 37} into account while others do not^{17, 24, 35, 36, 38, 39}. In a previous study,⁴⁰ we validated a GC-MS method for simultaneous determination of plasma [²H7] and natural cholesterol using blank subtraction. The aim of the present study was to elaborate an original method to calculate the simultaneous abundance of two labelled cholesterol tracers ([²H4] and [²H7]) in human plasma without interferences from both natural and cholesterol tracers with determination of the influence of isotopomers. This new method has been validated against a blank determination method.

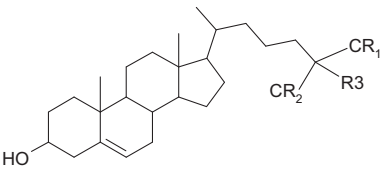
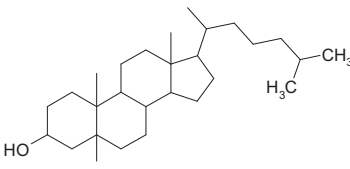
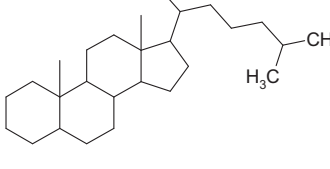
2. Experimental

2.1. Reagents and materials

Heptadeuterated cholesterol ([²H7]-Chol) (25,26,26,26,27,27,27-²H7 ; 98% enrichment) and tetradeuterated cholesterol ([²H4]-Chol) (25,26,26,26-²H4 ; 98% enrichment) were supplied by Eurisotop (St Aubin, France), epicoprostanol (Epi), cholesterol (Chol), 5 α -cholestane (table 1), methylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) by Sigma (St Quentin-Fallavier, France) and pyridine,

ethanol, hexane by Carlo Erba (Rueil-Malmaison, France). All chemicals used in this study were of analytical-reagent grade.

Table 1: Chemical structure of Cholesterol, [2H4]-Chol, [2H7]-Chol, epicoprostanol and cholestane.

 <p>Cholesterol: $R_1=R_2=H_3$; $R_3=H$ [2H4]-Chol : $R_1=D_3$; $R_2=H_3$; $R_3=D$ [2H7]-Chol : $R_1=R_2=D_3$; $R_3=D$</p>	 <p>Epicoprostanol</p>	 <p>Cholestane</p>
---	--	---

2.2. Analytical

Epi was selected as Internal Standard (IS) as described in a previous study⁴⁰. Analytical validation, including specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification, was conducted according to International Conference of Harmonisation (ICH) Q2B guidelines⁴¹ and Sciences et Techniques Pharmaceutiques (STP) recommendations^{42, 43}.

2.2.1. Sample preparation

Blood was collected in tubes containing EDTA-K3 and plasma was separated from whole blood by centrifugation at 2000g for 5 min at 20°C. Extraction procedure has been reported previously⁴⁴: briefly, 200 μ L plasma or 5 mM Chol alcoholic solution and 200 μ L internal standard in 0.005 mM alcoholic solution were well mixed with 1000 μ L hydrolysis reagent in glass-stoppered test tubes and incubated in a 70°C water-bath for 1 h. After cooling, 2 mL water and 5 mL hexane were added, moderately shaken. The organic phase was collected and evaporated under a stream of nitrogen at 60°C (water-bath). Samples were then silylated (MSTFA+pyridine 4:5 V/V) for 1 h. at 60°C. The dry residue was dissolved in 500 μ L hexane.

[2H4]-Chol and [2H7]-Chol were always determined in Chol solution (5 mmol/L) or in human plasma.

2.2.2. GC/MS conditions

GC-MS analyses have been performed on a Hewlett-Packard 6890 series II gas chromatograph fitted with a Hewlett-Packard 7673 automatic sampler and interfaced to a Hewlett-Packard 5973 mass spectrometer. The column was a HP-5MS 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness.

The injector temperature was 290°C, 2 μ L samples were injected in a splitless mode and the solvent delay time was 3 min. A programmed oven temperature was used at 100°C for 1 min and then raised to 290°C at a rate of 20°C/min. Helium was used as carrier gas with a flow rate of 1.0 mL/min.

The selective ion monitoring (SIM) mode was selected in order to quantify deuterated cholesterol ([2H4]-Chol and [2H7]-Chol simultaneously) in a medium containing about 5 mmol/L natural Chol or in human plasma samples.

2.2.3. [2H7]-Chol and [2H4]-Chol quantification

For quantitative analysis, the fragmentations were selected in the SIM mode: m/z 370 for Epi and m/z 336, 333 and 329 for [2H7]-Chol, [2H4]-Chol and Chol, respectively. For quantification, peak area ratios of the analytes to the IS were calculated as a function of the analyte concentration.

2.3. Statistics

All data were evaluated using ISO norm 5725 thanks to Excel 2002® and Winstat 2003.1® addin. Statistical significance was set at $p < 0.05$ probability level. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test whether groups of three or more cases have the same mean.

Cochran's, Pearson's and Student's t tests were used to evaluate the significance of linear relations.

3. Results

3.1. Specificity and linearity

Specificity between Chol and IS was provided by different retention times (RT) (16.80, 15.40 min for Chol and Epi, respectively). However, [2H4]-Chol (RT = 16.49 min, from a pure solution) and [2H7]-Chol (RT = 16.24 min, from a pure solution) were not separated in the presence of Chol because of the concentration ratio of these substances (1:5000 for [2H4] or [2H7]-Chol : Chol). Using the SIM mode enabled the quantification of all these analytes.

Studies of linearity using the two matrixes (pure Chol solution at 5 mmol/L or human plasma) showed comparable slope ($p = 0.98$, not significant(NS)) and y-intercepts ($p = 0.97$, NS) for [2H4]-Chol (n=8) and for [2H7]-Chol (n=8) ($p = 0.57$ and 0.99 for slope (NS) and y-intercept (NS), respectively).

3.2. Influence of [2H4]-Chol on [2H7]-Chol determination and [2H7]-Chol on [2H4]-Chol determination.

3.2.1. Influence of [2H4]-Chol on [2H7]-Chol determination

A given sample of [2H7]-Chol was added into plasma with or without addition of [2H4]-Chol in the range $5 \cdot 10^{-4}$ to 10^{-2} mM (n=7, in duplicate). [2H7]-Chol was measured in the presence or absence of [2H4]-Chol.

No noticeable influence of [2H4]-Chol was observed on [2H7]-Chol determination (Fig. 1).

3.2.2. Influence of [2H7]-Chol on [2H4]-Chol determination

A given sample of [2H4]-Chol was added into plasma with or without addition of [2H7]-Chol in

the range 5.10^{-4} to 10^{-2} mM (n=7, in duplicate). [2H4]-Chol was measured in the presence or absence of [2H7]-Chol.

A linear correlation was observed for [2H4]-Chol and [2H7]-Chol concentrations (Fig. 1). Therefore, observed [2H4]-Chol abundance must be corrected for [2H7]-Chol abundance to get actual [2H4]-Chol.

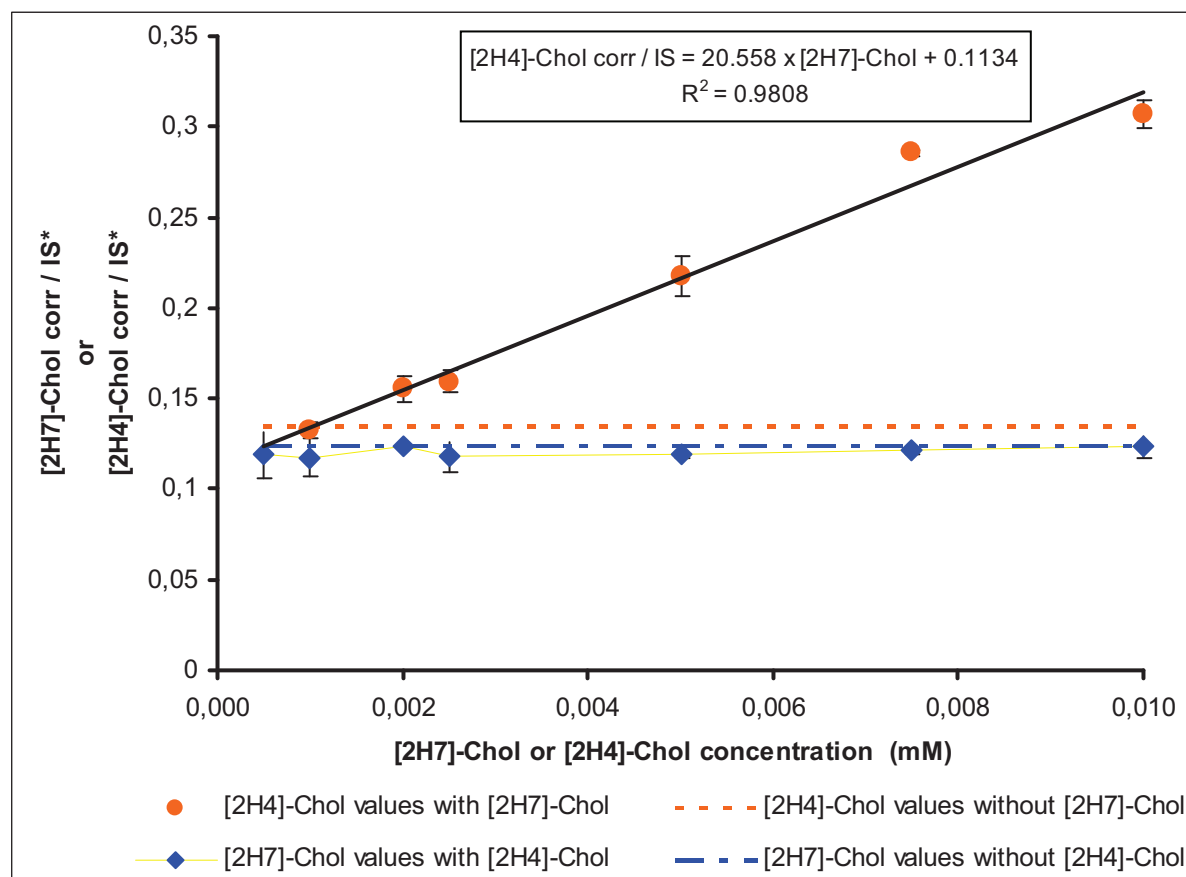


Figure 1. Influence of [2H4]-Chol on [2H7]-Chol determination and of [2H7]-Chol on [2H4]-Chol determination with Chol at 5 mmol/L (Dx corr = Dx-Chol calculated with the blank method).

For influence of [2H4]-Chol on [2H7]-Chol determination, [2H7]-Chol (\bullet)(10^{-3} mM) was determined (\pm SD) at each point of standard level ([2H4]-Chol = 5.10^{-4} to 10^{-2} mM) and compared to plasma values without [2H4]-Chol (- - -).

For influence of [2H7]-Chol on [2H4]-Chol determination, [2H4]-Chol (\blacklozenge)(10^{-3} mM) was determined (\pm SD) at each point of standard level ([2H7]-Chol = 5.10^{-4} to 10^{-2} mM) and compared to plasma values without [2H7]-Chol (— -).

3.3. Influence of natural cholesterol on [2H4]-Chol and [2H7]-Chol levels.

Ion m/z 333 and 336, the most stable and most abundant ions, were selected for [2H4]-Chol and [2H7]-Chol measurement, respectively. However, natural Chol fragmentation also gives ions m/z

333 and 336: these ions are in negligible quantity in relation to Chol, but can influence [2H4]-Chol and [2H7] Chol quantification because Chol, [2H4]-Chol and [2H7]-Chol are not resolved. Therefore, we aimed to check the reliability of two methods to determine the influence of natural cholesterol on [2H4]-Chol or [2H7]-Chol levels; i.e. blank subtraction or mathematical subtraction based on isotope abundance calculation.

3.3.1. Based on blank plasma determination.

We have determined the 336/329 (C2) and 333/329 (C1) ratios from a Chol solution in order to calculate a correction factor that could be used for calculation of actual [2H7]-Chol and [2H4]-Chol concentrations. The correction factors were determined with blank plasma for each standard curve ([2H7]-Chol and [2H4]-Chol).

Therefore, the correction factors are in the relation of abundance (abund.) of m/z 336 and 333 due to natural Chol fragmentation and can thus be calculated in relation to its concentration (called hereafter blank method) :

$$[2H7]\text{-Chol abund.} / IS(370) = ([2H7]\text{-Chol}(336) - \text{Chol}(329)*C2) / IS(370)$$

$$[2H4]\text{-Chol abund.} / IS(370) = ([2H4]\text{-Chol}(333) - \text{Chol}(329)*C1) / IS(370).$$

3.3.2. Based on abundance isotope calculation.

To determine the influence of natural cholesterol on [2H4]-Chol and [2H7]-Chol levels based on blank plasma, it was necessary to determine C1 and C2 for each patient with blank plasma. Unfortunately, in some cases it was not possible to get this blank plasma. In order to determine [2H4]-Chol and [2H7]-Chol levels too, we aimed to use another calculation method based on isotope abundance.

Natural Chol provides m+1/z to m+7/z isotopomers. The level of each isotopomer can be calculated using Isotope Pattern Calculator®⁴⁵ (Table 2). It thus appears that there is about 0.034938 % m+4/z (= C3) (corresponding to [2H4]-Chol) and 0.000005 % m+7/z (= C4)

(corresponding to [2H7]-Chol) from 100% of $m/z = 329$ (natural Chol). Furthermore, [2H4]-Chol brings 0.034730 % $m+3/z$ (= C5) (i.e. $m/z = 336$ corresponding to [2H7]-Chol). Moreover, experimental data show that [2H7]-Chol brings about 5.45% of $m-3/z$ (= C6) (i.e. $m/z = 333$ corresponding to [2H4]-Chol).

Using this figure, it is possible to determine actual [2H4]-Chol and [2H7]-Chol levels in each sample in a two-step procedure (called hereafter isotope calculation).

First, given [2H4]-Chol has no influence on [2H7]-Chol determination (§3.2.1) [2H7]-Chol calculated abundance is [2H7]-Chol(336) observed minus $m+7/z$ brought by natural cholesterol. This value was corrected by the small amount brought by [2H4]-Chol(333). Then the ratio with the IS was calculated as follow:

$$\begin{aligned} & \text{[2H7]-Chol-calc abund./IS(370)} \\ & = ((\text{[2H7]-Chol(336)} - \text{Chol(329)*C}_4) - \text{[2H4]-Chol(333)*C}_5) / \text{IS(370)} \end{aligned}$$

Secondly, given [2H4]-Chol abund. must be corrected by [2H7]-Chol abund. calculated in the first step:

$$\begin{aligned} & \text{[2H4]-Chol-calc abund./IS(370)} \\ & = (\text{[2H4]-Chol(333)} - \text{Chol(329)*C}_3 - \text{[2H7] Chol-calc(336)*C}_6 * \text{IS(370)}) / \text{IS(370)}. \end{aligned}$$

Table 2. Contribution of $m+n/z$ for Cholesterol, [2H4]-Chol and [2H7]-Chol.

m/z	Cholesterol $m/z = 329$	[2H4]-Chol $m/z = 333$	[2H7]-Chol $m/z = 336$
329	100 %	-	-
333	0.034938 % = C ₃	100 %	5.45 % = C ₆
336	0.000005 % = C ₄	0.034730 % = C ₅	100 %

3.4. Linearity, Limits of Detection and Quantification

Linearity has been studied in the same range (5.10^{-4} to 10^{-2} mM) at 7 levels in duplicate. An

excellent agreement ($r > 0.996$) between the observed and expected values was obtained with both methods of calculation (blank method and isotope calculation).

Standard curves were prepared for the two analytes and the following equations were used to calculate the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for each compound⁴¹ :

$$\text{LOD} = 3 \sigma / S ; \text{LOQ} = 10 \sigma / S$$

where σ is the standard deviation of the response (estimated from the standard deviation of the blank) and S is the slope of the standard curve.

As shown in table 3, studies of linearity using these two methods of calculation (blank method and isotope calculation) provide a comparable slope and the same y-intercept for [2H4]-Chol and [2H7]-Chol.

Table 3. Linearity, LODs and LOQs of standard curves

Substance	Linear range (mmol/L)	Calibration equation (y = area ratio, x = mmol/L) and Spearman's coefficients (r)		LOD (mmol/L)	LOQ (mmol/L)
		Blank method	Isotope calculation		
[2H4]-Chol	5.10^{-4} to 10^{-2}	y = 167.7 x + 0.0498 r = 0.998	y = 165.1 x + 0.185 r = 0.998	$1.29.10^{-4}$	$3.89.10^{-4}$
[2H7]-Chol	5.10^{-4} to 10^{-2}	y = 62.6 x + 0.00962 r = 0.997	y = 61.9 x + 0.0675 r = 0.997	$4.37 10^{-5}$	$1.32.10^{-4}$

3.5. Precision and accuracy

3.5.a. Repeatability and Reproducibility

According to the ISO 5725-1 norm, with n=6 at 4 levels, in the range 5.10^{-4} to 10^{-2} mM, repeatability and reproducibility were 6.43 % and 6.25 %, respectively, for [2H4]-Chol and 7.19 % and 7.27 %, respectively, for [2H7]-Chol.

3.5.b. Accuracy

The accuracy of the injector has been studied using two different solutions of cholestane injected

10 times. Relative standard deviation of 5.10^{-4} to 10^{-2} mM cholestane was 2.50% and 3.48 %, respectively.

According to the ISO 5725-1 norm, with $n=6$ at 4 standard solution levels, in the range 5.10^{-4} to 10^{-2} mM, accuracy was 102.4 ± 5.70 % and 100.55 ± 2.63 % for [2H4]-Chol and [2H7] Chol respectively, using the blank method and 100.0 ± 5.21 % and 99.6 ± 3.30 % for [2H4]-Chol and [2H7]-Chol, respectively, using the isotope calculation.

3.6. Recovery

Four plasma samples, spiked with both [2H4]-Chol and [2H7]-Chol standard, were analyzed in triplicate. Recoveries of [2H4]-Chol were 100.6 ± 5.23 % and 100.3 ± 3.04 % using the blank and isotope calculation methods, respectively, and recoveries of [2H7]-Chol were $102.3 \pm 5.67\%$ and $97.3 \pm 4.01\%$ using the blank and isotope calculation methods, respectively.

The power analysis ($1-\beta$, where β represents type II error), in this quantitative analytical method could be estimated as 84 % and 94 % for [2H7]-Chol and [2H4]-Chol, respectively. It is important to mention that if there is no conventional criterion to determine what is a suitable statistical power, however, a value of 80% is generally considered as the minimum desirable⁴⁶.

4. Discussion and conclusion

We have developed a reliable, simple and fast method for simultaneous quantification of two labelled cholesterol moieties, such as [2H7]-Chol and [2H4]-Chol (as tracers) and natural Chol in human plasma, using GC–MS. The method offers high sensitivity and good accuracy and precision and could easily be used for metabolic studies of cholesterol tracers in humans. Rosenblatt *et al.*⁴⁷ developed a method using a system of linear equations to transform raw GC-MS data, consisting of relative abundance ratios of the natural species and the labelled sample,

into the molar ratio of the tracer versus unlabelled species. Although this method does not require standards of the measured material, many of the correction factors that take into account isotopic impurity and ionization effects in the mass spectrometer are calculated theoretically and are not really measured. Lee and others authors⁴⁸⁻⁵¹ have used a mathematical matrix to solve series of linear equations where the different terms in the matrix correspond to different isotopomers to be determined. Different isotopomer calculations have been proposed in the literature⁴⁷⁻⁵², but they are complex, with numerous correction factors. Moreover, Fernandez *et al.*⁵¹ demonstrated that the mass isotopomer distribution is not different between labelled and unlabelled elements having low natural abundance of heavy isotopes. A new simple calculation method to determine labelled tracers in the presence of the natural component is proposed here. The calculation method was validated against the blank method and performed without a molecular peak^{47,51} but with a fragment peak. This method does not request any blank determination and its validity has been demonstrated in human plasma for [2H7]-Chol, [2H4]-Chol and natural cholesterol. This validated method saves time, as well as reagents and samples, and might be extrapolated to many other determinations involving stable isotope-enriched tracers.

REFERENCES

1. D.B. Zilversmit, Proc Soc Exp Biol Med.1972 140: 862.
2. E. Quintao, S.M. Grundy, E.H. Ahrens, Jr., J Lipid Res.1971 12: 221.
3. B. Borgstrom, J Lipid Res.1969 10: 331.
4. S.M. Grundy, E.H. Ahrens, Jr., G. Salen, J Lab Clin Med.1971 78: 94.
5. P. Samuel, J.R. Crouse, E.H. Ahrens, Jr., J Lipid Res.1978 19: 82.
6. H.S. Sodhi, B.J. Kudchodkar, P. Varughese, D. Duncan, Proc Soc Exp Biol Med.1974 145: 107.
7. W.J. Simmonds, A.F. Hofmann, E. Theodor, J Clin Invest.1967 46: 874.

8. S.M. Grundy, H.Y. Mok, *J Lipid Res.*1977 18: 263.
9. H.Y. Mok, K. Von Bergmann, S.M. Grundy, *J Lipid Res.*1979 20: 389.
10. S.M. Grundy, E.H. Ahrens, Jr., *J Lipid Res.*1969 10: 91.
11. J.D. Wilson, C.A. Lindsey, Jr., *J Clin Invest.*1965 44: 1805.
12. D.B. Zilversmit, L.B. Hughes, *J Lipid Res.*1974 15: 465.
13. J.R. Crouse, S.M. Grundy, *J Lipid Res.*1978 19: 967.
14. Y. Wang, C.A. Vanstone, W.D. Parsons, P.J. Jones, *Lipids.*2004 39: 87.
15. M.S. Bosner, L.G. Lange, W.F. Stenson, R.E. Ostlund, Jr., *J Lipid Res.*1999 40: 302.
16. M.S. Bosner, R.E. Ostlund, Jr., O. Osofisan, J. Grosklos, C. Fritschle, L.G. Lange, *J Lipid Res.*1993 34: 1047.
17. D. Lutjohann, C.O. Meese, J.R. Crouse, 3rd, K. Von Bergmann, *J Lipid Res.*1993 34: 1039.
18. J. Ferezou, F. Chevallier, *Biochim Biophys Acta.*1982 713: 678.
19. J. Ferezou, T. Coste, F. Chevallier, *Digestion.*1981 21: 232.
20. W.W. Wong, D.L. Hachey, L.L. Clarke, S. Zhang, *J Nutr.*1995 125: 612S.
21. F.Y. Ntanios, P.J. Jones, *Atherosclerosis.*1999 143: 341.
22. R.E. Ostlund, Jr., M.S. Bosner, W.F. Stenson, *J Lipid Res.*1999 40: 1453.
23. P.J. Jones, M. Raeini-Sarjaz, F.Y. Ntanios, C.A. Vanstone, J.Y. Feng, W.E. Parsons, *J Lipid Res.*2000 41: 697.
24. G. Gremaud, C. Piguet, M. Baumgartner, E. Pouteau, B. Decarli, A. Berger, L.B. Fay, *Rapid Commun Mass Spectrom.*2001 15: 1207.
25. D.S. Goodman, F.R. Smith, A.H. Sepowitz, R. Ramakrishnan, R.B. Dell, *J Lipid Res.*1980 21: 699.
26. R.E. Ostlund, Jr., C.A. Spilburg, W.F. Stenson, *Am J Clin Nutr.*1999 70: 826.
27. N.R. Matthan, A.H. Lichtenstein, *Atherosclerosis.*2004 174: 197.

28. R.E. Ostlund, Jr., F.F. Hsu, M.S. Bosner, W.F. Stenson, D.L. Hachey, J Mass Spectrom.1996 31: 1291.
29. R.S. Tilvis, T.A. Miettinen, Am J Clin Nutr.1986 43: 92.
30. J.J. Agren, M. Hallikainen, H. Vidgren, T.A. Miettinen, H. Gylling, Clin Chim Acta.2006 366: 309.
31. T.A. Miettinen, R.S. Tilvis, Y.A. Kesaniemi, Am J Epidemiol.1990 131: 20.
32. T.A. Miettinen, T.E. Strandberg, H. Gylling, Arterioscler Thromb Vasc Biol.2000 20: 1340.
33. H. Gylling, T.A. Miettinen, J Lipid Res.2002 43: 1472.
34. H.J. Kempen, P. De Knijff, D.I. Boomsma, H.A. Van Der Voort, J.A. Gevers Leuven, L. Havekes, Metabolism.1991 40: 604.
35. E.B. Pouteau, I.E. Monnard, C. Piguet-Welsch, M.J. Groux, L. Sagalowicz, A. Berger, Eur J Nutr.2003 42: 154.
36. G. Gremaud, E. Dalan, C. Piguet, M. Baumgartner, P. Ballabeni, B. Decarli, M.E. Leser, A. Berger, L.B. Fay, Eur J Nutr.2002 41: 54.
37. M. Di Buono, P.J. Jones, L. Beaumier, L.J. Wykes, J Lipid Res.2000 41: 1516.
38. B. Lindenthal, T.A. Aldaghtas, A.L. Holleran, T. Sudhop, H.K. Berthold, K. Von Bergmann, J.K. Kelleher, Am J Physiol Endocrinol Metab.2002 282: E1222.
39. D.Q.-H. Wang, M.C. Carey, Journal of Lipid Research, 2003 44: 1042.
40. G. Beaumier-Gallon, J. Lanfranchi, M.F. Vergnes, D. Lairon, J. Pastor, A.M. Pauli, H. Portugal, J Chromatogr B Biomed Sci Appl.1998 718: 23.
41. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH Q2B. 1996, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMP/ICH/281/95).

42. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, STP Pharma Pratiques.2003 13: 101
43. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, STP Pharma Pratiques.2006 16: 30
44. G. Beaumier-Gallon, C. Dubois, H. Portugal, D. Lairon, Atherosclerosis.1998 141 Suppl 1: S81.
45. J. Yan, Isotope Pattern Calculator v4.5. 2001, <http://www-personal.umich.edu/~junhuay/pattern.htm>.
46. P. Araujo, L. Froyland, Journal of Chromatography B.2007 847: 305.
47. J. Rosenblatt, D. Chinkes, M. Wolfe, R.R. Wolfe, AJP - Endocrinology and Metabolism.1992 263: E584.
48. W.-N.P. Lee, L.O. Byerley, E.A. Bergner, J. Edmond, Biological Mass Spectrometry.1991 20: 451.
49. Y.Y. Lin, W.B. Cheng, C.E. Wright, Analytical Biochemistry.1993 209: 267.
50. J.A. Vogt, T.E. Chapman, D.A. Wagner, V.R. Young, J.F. Burke, Biological Mass Spectrometry.1993 22: 600.
51. C.A. Fernandez, C. Des Rosiers, S.F. Previs, F. David, H. Brunengraber, Journal of Mass Spectrometry.1996 31: 255.
52. M.E. Jennings, D.E. Matthews, Analytical Chemistry.2005 77: 6435.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La relation entre un régime riche en cholestérol et en acides gras saturés et des valeurs élevées de cholestérol total et de LDL-cholestérol a largement été démontrée lors d'études à grande échelle. Cependant l'implication spécifique du cholestérol alimentaire dans le développement des MCV reste toujours très discutée. La mesure de l'absorption intestinale du cholestérol permet d'apprécier spécifiquement les relations qui existent entre l'apport de cholestérol exogène et biliaire et les niveaux plasmatiques de cholestérol, tout en considérant l'homéostasie du cholestérol et les variations d'absorption induites par des polymorphismes génétiques lorsqu'ils sont étudiés. Cette absorption peut être mesurée par des marqueurs indirects et directs. Seuls les marqueurs indirects ou « non-cholestérol stérols », peuvent être utilisés lors d'études à grande échelle, ce qui représente l'avantage majeur de la méthode indirecte. Cependant, la seule méthode qui puisse quantifier, avec précision, le taux d'absorption du cholestérol est la méthode directe qui, en raison de considérations pratiques (nombre de sujets limité), éthique (administration IV) et financière (coût des isotopes stables), est beaucoup moins utilisée.

Afin de tester l'influence du **régime alimentaire** sur les concentrations plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol, nous avons étudié les marqueurs d'absorption et de synthèse du cholestérol sur une cohorte de 125 sujets non traités, présentant au moins un facteur de risque cardio-vasculaire.

On a montré qu'en modifiant les habitudes alimentaires, en passant d'un régime occidental à un régime de type Méditerranéen apportant deux fois moins de cholestérol et moins d'acides gras saturés, le statut d'absorption du cholestérol d'un sujet, déterminé par la méthode indirecte, n'était pas modifié, quelque soit le sexe.

Les marqueurs d'absorption et de synthèse sont fréquemment utilisés pour étudier le métabolisme du cholestérol, mais peu d'auteurs se sont intéressés à l'effet de différents régimes sur le statut d'absorbeur lors d'interventions nutritionnelles (Sarkkinen *et al.* 1998; Nissinen *et*

al. 2008b). Nous avons ainsi comparé les concentrations des marqueurs (cholestanol, campestérol, sitostérol, desmostérol et lathostérol) en fonction du niveau d'absorption des sujets, en s'étant assuré au préalable que les apports en cholestérol étaient identiques entre les trois groupes d'absorbeurs (faibles, intermédiaires et forts absorbeurs) à T0 et à T3mois (**Article n°1**). Bien que les taux des marqueurs d'absorption aient augmenté chez les faibles absorbeurs et qu'ils aient diminué chez les forts absorbeurs après 3 mois de régime de type Méditerranéen, ces variations de concentrations plasmatiques n'ont pas modifié le statut. En effet, les faibles absorbeurs passaient en moyenne de $82 \text{ à } 96 \times 10^2 \text{ mmol}$ de cholestanol /mol de cholestérol, une valeur qui reste inférieure à celle qui définit le 1^{er} tertile ($112 \times 10^2 \text{ mmol}$ de cholestanol /mol de cholestérol) et de même pour les intermédiaires (valeurs de cholestanol comprises entre 112 et $155.10^2 \text{ mmol/mol}$ de cholestérol) et les forts absorbeurs ($\text{cholestanol} > 155.10^2 \text{ mmol/mol}$ de cholestérol). Nous avons également procédé à une vérification individuelle de ces données et constaté que la grande majorité des sujets (90%) restait en effet dans le groupe d'absorbeur prédéfini à T0. Par ailleurs, en calculant le rapport de concentration d'un marqueur de synthèse sur un marqueur d'absorption (lathostérol/cholestanol ou lathostérol/campestérol), on obtient une valeur indicative de l'homéostasie du cholestérol. Ce rapport demeure élevé chez les faibles absorbeurs après intervention, ce qui confirme que la diminution de cholestérol alimentaire et d'acides gras saturés induite par le régime a peu d'influence sur les niveaux d'absorption et de synthèse, pour une durée de régime limitée à 3 mois. La sensibilité des marqueurs n'est donc pas modifiée par le changement de régime comme le démontrent aussi d'autres auteurs (Nissinen *et al.* 2008b). Cette notion de stabilité des marqueurs dans le temps pour un individu donné stipule l'existence de facteurs intrinsèques, propres à chaque individu, et donc l'implication à priori de facteurs génétiques dans ces processus et la réponse à un régime.

Le second aspect original qui ressort de cette étude est que la diminution du cholestérol circulant induite par le régime de type méditerranéen est plus marquée chez les faibles absorbeurs de cholestérol.

La réponse à un régime sain, de type méditerranéen, est en effet plus marquée en terme de diminution de LDL-cholestérol chez des sujets faibles absorbeurs de cholestérol et quel que soit le sexe. On peut supposer que les forts absorbeurs ont une réponse moins favorable au régime en raison d'un flux entrant de cholestérol biliaire et exogène plus élevé qui s'accompagne d'une trop faible diminution de synthèse, signant peut-être un défaut d'adaptation qui pourrait être lié à la physio-pathologie de certains sujets.

Le second paramètre biochimique qui est modulé par le statut d'absorbeur, mais pas par le régime, est l'insulinémie. On constate que la concentration plasmatique d'insuline est plus élevée chez les faibles absorbeurs à T0 et à T3. Des relations entre le métabolisme du cholestérol et celui du glucose ont été décrites: l'insuline exercerait une action stimulante sur la synthèse du cholestérol et une action inhibitrice sur l'absorption du cholestérol, mais les mécanismes impliqués ne sont pas connus à ce jour (Gylling *et al.* 2010). On peut supposer que l'insuline agisse par la voie des récepteurs nucléaires LXR α connus pour augmenter la lipogenèse et la synthèse de cholestérol via SREBP-2 (Eberle *et al.* 2004).

Il serait nécessaire d'examiner l'ensemble de ces données sur de plus grandes cohortes afin de vérifier la relation entre statut d'absorbeur et diminution de LDL-cholestérol induite par un régime pauvre en acides gras et cholestérol et de déterminer les principaux acteurs impliqués (transporteurs membranaires du cholestérol, récepteurs nucléaires...), notamment par de possibles associations avec leurs polymorphismes génétiques. L'absorption et la synthèse sont effectivement influencées par des facteurs génétiques (Kempen *et al.* 1991; Sehayek *et al.* 1998a) mais également par l'action de l'insuline (Gylling *et al.* 2004), une hormone elle-même régulée par de nombreux gènes.

Ces réflexions nous ont conduit à poursuivre notre étude sur la cohorte MEDI-Rivage, mais uniquement chez les femmes, en y associant des **facteurs génétiques** susceptibles d'être impliqués dans cette réponse au régime plus marquée chez les faibles absorbeurs (**Article n° 2**).

Nous nous sommes d'abord intéressés aux polymorphismes de la MTP (Microsomal triglyceride transfer protein), une protéine indispensable à l'assemblage des chylomicrons dans l'entérocyte et à celui des VLDL dans l'hépatocyte. De larges investigations ont déjà été menées sur cette protéine, en revanche, aucune étude n'a comparé les niveaux d'absorption et de synthèse du cholestérol après intervention alimentaire en fonction des génotypes du SNP -493G>T de la MTP. Nos résultats ont permis de montrer pour la première fois que ce polymorphisme est associé aux marqueurs d'absorption du cholestérol (cholestanol, sitostérol), et que cette relation est modulée par le régime, car elle est uniquement observée sous un régime occidental.

Sous leur régime habituel de type occidental, les femmes homozygotes pour l'allèle T présentaient des concentrations significativement plus élevées en cholestanol ($199,0 \pm 30,0$ versus $133 \pm 7,4 \times 10^2$ mmol/mol cholestérol) et en sitostérol ($261,1 \pm 104,7$ versus $109,0 \pm 9,9 \times 10^2$ mmol/mol cholestérol) comparé aux sujets porteurs de l'allèle G. Parallèlement, les concentrations de cholestérol total ($7,37 \pm 0,22$ versus $6,63 \pm 0,12$ mmol/L), de TRL-cholestérol ($1,37 \pm 0,31$ versus $0,95 \pm 0,08$ mmol/L) et de cholestérol transporté par des lipoprotéines contenant l'apoB ($6,07 \pm 0,47$ versus $5,16 \pm 0,16$ mmol/L) étaient également plus élevées chez les homozygotes TT, alors que les niveaux de HDL-cholestérol et de triglycérides ne différaient pas en fonction du génotype. L'élévation isolée de cholestérol circulant (TRL et VLDL), sans augmentation significative des triglycérides, illustre bien l'implication de ce polymorphisme dans le processus d'absorption/resécrétion du cholestérol.

Après 3 mois de régime de type méditerranéen, seules les femmes homozygotes TT montrent une diminution significative des concentrations des marqueurs d'absorption, aboutissant à des valeurs comparables aux porteurs de l'allèle G. En outre, une diminution plus importante des taux plasmatiques de LDL-cholestérol (2,3 fois) et de cholestérol total (2,4 fois) est observée chez les femmes TT par rapport aux femmes GG et GT. Cela montre, par conséquent, que l'effet stimulant du régime occidental sur l'absorption du cholestérol est aboli sous un régime pauvre en graisses saturées et en cholestérol de type méditerranéen. Cette interaction polymorphisme-

régime se traduit ainsi par une plus grande capacité des homozygotes TT à s'adapter à un régime « sain ».

Si l'on se réfère aux données de l'article n°1, on aurait pu supposer que les femmes possédant l'allèle G auraient davantage diminué leur concentration de LDL-cholestérol après 3 mois de régime de type méditerranéen, puisque leurs niveaux d'absorption est en moyenne plus bas que les TT sous régime occidental, or on constate exactement l'effet inverse. Pour éviter l'interaction de ce polymorphisme avec le sexe comme déjà rapporté (Gastaldi *et al.* 2007), nous avons analysés les données dans une sous-population de 69 femmes sur les 125 sujets de l'étude n°1. Au risque de perdre en puissance statistique, il n'était pas possible de subdiviser cette sous-population en tertiles, ni même en deux groupes, afin de considérer des sujets faibles et forts absorbeurs pour chacun des génotypes. Cela suggère la nécessité de confirmer nos résultats dans une plus grande cohorte. Par ailleurs, chez les hommes de cette cohorte, l'étude du polymorphisme ne donnait pas de résultats pertinents, car aucun homme parmi les 125 sujets n'était homozygote TT. La comparaison ne pouvait donc se faire qu'entre GG et GT.

Dans le cadre de l'étude MEDI-Rivage, nous avons également testé d'autres interactions du type « absorption du cholestérol-polymorphisme-régime ».

Les polymorphismes de la lipase hépatique (LH), de la lipoprotéine lipase (LPL), des apoE, A4, C3 et B, de l'I-FABP (Intestinal fatty acid binding protein) et du transporteur SR-B1 ont également été étudiés afin de déterminer de potentielles relations entre les génotypes et les marqueurs d'absorption et de synthèse du cholestérol. Toutefois, aucune association n'a été observée pour les SNPs suivants : LH -514C>T, LPL -93T>G, apo A-IV Thr347>Ser, apoB -516C>T, apo C-III sst1, I-FABP Ala54>Thr.

Les polymorphismes de l'apoE pour les allèles e2, e3 et e4 ne sont pas non plus associés à une variation des niveaux d'absorption et de synthèse du cholestérol quels que soient le sexe et le

régime dans cette population Caucasienne, confirmant les résultats d'autres études apparentées (Kempen *et al.* 1991; Bosner *et al.* 1999; Von Bergmann *et al.* 2003; Nissinen *et al.* 2008a).

Seul le SNP p.Gly2Ser localisé dans l'exon 1 de SR-B1 est associé aux marqueurs d'absorption chez la femme, mais ce n'est pas le cas des SNPs des exons 5 et 8. Les femmes portant l'allèle rare (n=16) montrent des concentrations de cholestanol, de sitostérol et de campestérol significativement plus basses que les homozygotes 1/1 (n=57), mais uniquement sous régime de type méditerranéen. Parallèlement, la présence de l'allèle 2 est associée à une diminution plus marquée du cholestérol total (-7,2% *versus* -4,6%) et du LDL-cholestérol (-8,7% *versus* -4,3%) comparé aux sujets homozygotes 1/1 après intervention, mais cette tendance n'est pas significativement différente entre les génotypes. Elle va cependant dans le même sens que les résultats obtenus par Martinez *et al.* pour les génotypes 1/1 et 1/2 uniquement (Perez-Martinez *et al.* 2003). Bien que les génotypes 1/2 et 2/2 soient associés à un niveau d'absorption du cholestérol plus bas, on n'a pas observé de variation du phénotype, quels que soient l'allèle et le régime (occidental ou de type méditerranéen). Ces résultats suggèrent que l'allèle 2 pour ce SNP contribue au statut de faible absorbeur chez les femmes uniquement, puisque le niveau d'absorption reste le même à l'entrée et après 3 mois d'intervention.

L'exploitation des données concernant plusieurs SNPs des gènes *ABCG5*, *ABCG8* et *NPC1L1* dans l'étude MEDI-Rivage n'est pas suffisamment avancée à ce jour pour apporter des renseignements sur d'éventuelles associations entre les polymorphismes, le régime, les niveaux d'absorption et le sexe.

Au terme de ces travaux, nous avons montré que l'absorption intestinale du cholestérol est influencée par des facteurs nutritionnels et génétiques. L'efficacité d'absorption du cholestérol, de laquelle se dégage la notion de faible et fort absorbeur, est donc propre à chaque individu et est basé sur des traits génétiques. On a également démontré que le statut d'absorbeur était plutôt stable dans le temps et sous différents régimes, mais qu'il module la réponse au régime, ce qui

illustre l'importance de la notion du statut d'absorbeur dans la prise en charge nutritionnelle personnalisée des sujets.

La suite naturelle à ce travail de thèse est de comparer la mesure de la capacité d'absorption *versus* le taux d'absorption du cholestérol en associant les méthodes indirecte et directe, ce qui permettrait de faire le lien entre le taux d'absorption mesuré par les marqueurs directs et le caractère fort ou faible absorbeur, déduit des marqueurs dans différentes cohortes.

Suite aux travaux déjà réalisés dans notre laboratoire sur le sujet sain (Beumier-Gallon *et al.* 1998a; Beumier-Gallon *et al.* 1998b; Beumier-Gallon *et al.* 2001), notre travail a aussi consisté à mettre au point et à valider une **technique analytique** de dosage simultané du D4-cholestérol et du D7-cholestérol en présence de cholestérol naturel, afin de déterminer le taux d'absorption du cholestérol chez des sujets sains et dyslipémiques (**Article n°3**).

L'équipement de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est un appareil d'analyse très sensible, capable de séparer et de quantifier deux formes de cholestérol deutéré utilisées comme traceurs, dont les caractéristiques physico-chimiques sont très proches du cholestérol naturel. Les trois molécules se distinguent essentiellement par leurs différences de masse, qui restent cependant très faibles.

Malgré ces faibles écarts de masse et une différence de concentration importante entre le cholestérol plasmatique et le cholestérol marqué (le D4 et le D7-cholestérol sont 1000 à 5000 fois moins concentrés), on obtient des limites de quantification de 4.10^{-4} mmol/L pour le D4-cholestérol et de 1.10^{-4} mmol/L pour le D7-cholestérol, ce qui signifie que ces traceurs peuvent être quantifiés en dilution 1/10 000 par rapport au cholestérol plasmatique.

La linéarité et la répétabilité ont été évaluées sur sept points de gamme aux concentrations habituellement utilisées pour réaliser nos courbes de calibration. Les coefficients de régression étant très proches de l'unité et les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité

étant inférieurs à 5 %, la méthode, validée selon la norme ISO 5725-1, est donc parfaitement applicable.

L'essai de justesse a montré des pourcentages de recouvrement de l'ordre de 100 ± 5 %.

En raison d'interférences analytiques liées aux isotopomères du cholestérol naturel et afin d'éviter un biais lors de la mesure des concentrations sériques de D4 et de D7-cholestérol, il est nécessaire d'appliquer des facteurs de correction tenant compte de ces influences. Nous avons, dans ce but, développé et comparé deux méthodes de calcul :

- une méthode par soustraction du blanc, qui avait déjà été utilisée dans de précédents travaux (Beaumier-Gallon *et al.* 1998b) ;
- une méthode originale par soustraction mathématique des abondances isotopiques (**Article n°3**).

Elles donnent des résultats comparables. La seconde présente cependant l'avantage de pouvoir se passer du sérum « blanc », qui correspond au prélèvement à T0, précédant l'administration simultanée des deux traceurs.

D'autres méthodes, se référant aux abondances des différents isotopomères, ont déjà été proposées (Lee *et al.* 1991; Rosenblatt *et al.* 1992; Fernandez *et al.* 1996; Jennings *et al.* 2005), mais elles ne sont basées que sur des calculs théoriques sans applications expérimentales. Certains auteurs font état de matrices mathématiques et d'équations complexes, d'autres intègrent les pics moléculaires et non pas les fragments pour doser les composés.

Cette méthode par soustraction mathématique des abondances isotopiques est simple, reproductible et peut être extrapolée aux dosages d'autres isotopes stables, car il n'existe pas de différences de distribution des isotopomères entre les éléments marqués et non marqués (Fernandez *et al.* 1996).

Nous avons ainsi validé une méthode de dosage relativement simple et rapide qui permet de quantifier simultanément deux isotopes du cholestérol dans une matrice complexe, le sérum.

Des études chez l'homme peuvent donc être envisagées.

Nous possédons effectivement deux traceurs au sein de notre laboratoire, le D4- et le D7-cholestérol. Les doses de marqueurs à administrer ont déjà été estimées grâce aux précédents travaux menés dans le laboratoire, qui consistaient à étudier le devenir du cholestérol alimentaire en période postprandiale chez des sujets normaux à l'aide du D7-cholestérol (Beaumier-Gallon *et al.* 1998a; Beaumier-Gallon *et al.* 2001). Cette étude cinétique a montré que l'état d'équilibre du traceur heptadeutééré dans le plasma se situait vers la 24ème heure et que sa concentration plasmatique à l'équilibre était en moyenne de 6.10^{-3} mmol/L après administration *per os* d'une dose de 80 mg.

Pour la mesure du taux d'absorption du cholestérol avec deux isotopes stables, les traceurs doivent être administrés simultanément : le D4-cholestérol par voie orale au cours d'un repas test (80 mg incorporé dans 25 g de beurre) et le D7-cholestérol par voie intraveineuse (40 mg). Le choix des voies d'administration est lié à notre étude d'interférence entre D4- et D7-cholestérol (article n°3). Seul le D7-cholestérol interfère sur le D4-cholestérol de façon significative. Il est donc préférable de ne pas majorer cette variabilité en l'administrant par voie orale.

En attendant que l'étude par double marquage isotopique puisse être réalisée, le dosage simultané du D7-cholestérol ingéré et des marqueurs indirects est programmé dans l'étude Vitagènes, pour laquelle des hommes âgés de 18 à 60 ans ont été recrutés jusqu'en mai 2009. L'étude clinique est en cours et se poursuivra jusqu'à la mi-décembre 2010. L'originalité de cette étude réside principalement dans la sélection préalable des volontaires en fonction de leurs génotypes pour des SNPs des gènes *NPC1L1*, *SR-B1* et *CD36*.

La composante génétique impliquée dans la variabilité interindividuelle d'absorption du cholestérol exogène en période postprandiale va ainsi être étudiée parallèlement à l'absorption de micronutriments lipophiles (lycopène, lutéine, vitamines E et D) qui se fait par le biais des mêmes récepteurs (*NPC1L1*, *SR-B1* et *CD36*).

Dans cette étude, pour des raisons pratiques et économiques, nous n'administrons qu'un seul marqueur direct (D7-cholestérol) par voie orale et nous utilisons la méthode simplifiée de Jones *et al.* pour mesurer le taux d'absorption du cholestérol (Wang *et al.* 2004c).

On pourra alors comparer les deux méthodes (directe et indirecte) en mettant en évidence l'absorption relative du cholestérol dans les différents groupes de sujets étudiés, tout en déterminant de façon optimale leur statut faible ou fort absorbeur de cholestérol. Enfin, soulignons que l'étude directe de l'absorption du cholestérol n'a jamais été réalisée chez des sujets normaux dont les polymorphismes génétiques ont été préalablement déterminés.

Pour conclure, la variabilité d'absorption du cholestérol chez l'homme peut être étudiée à l'aide de deux approches analytiques :

- la méthode indirecte, à utiliser préférentiellement et uniquement pour de grandes cohortes, car il n'y a pas de consensus quant à son application et il existe d'importantes variations méthodologiques entre les laboratoires. Bien que cette méthode ne permette pas une mesure directe du taux d'absorption du cholestérol, le dosage des marqueurs indirects constitue une approche plus globale de l'homéostasie du cholestérol en reflétant à la fois les niveaux d'absorption et la synthèse du cholestérol.
- la méthode directe, qui est la méthode de référence et qui reste à privilégier tant que le nombre de sujets de l'étude ne constitue pas une limite.

La poursuite de ces travaux de thèse aura pour but de comparer et de corrélérer ces deux méthodes dans de nouvelles études, tout en considérant leurs limites d'application respectives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Accad M**, Smith SJ, Newland DL, Sanan DA, King LE, Jr., Linton MF, Fazio S and Farese RV, Jr. Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J Clin Invest.* **2000**; 105(6): 711-9.
- Acton S**, Osgood D, Donoghue M, Corella D, Pocovi M, Cennaro A, Mozas P, Keilty J, Squazzo S, Woolf EA and Ordovas JM. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1999**; 19(7): 1734-43.
- Acton S**, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH and Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* **1996**; 271(5248): 518-20.
- Acton SL**, Scherer PE, Lodish HF and Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* **1994**; 269(33): 21003-9.
- Aggarwal D**, West KL, Zern TL, Shrestha S, Vergara-Jimenez M and Fernandez ML. JTT-130, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor lowers plasma triglycerides and LDL cholesterol concentrations without increasing hepatic triglycerides in guinea pigs. *BMC Cardiovasc Disord.* **2005**; 5: 30.
- Agren JJ**, Hallikainen M, Vidgren H, Miettinen TA and Gylling H. Postprandial lipemic response and lipoprotein composition in subjects with low or high cholesterol absorption efficiency. *Clin Chim Acta.* **2006**; 366(1-2): 309-15.
- Ahmida HS**, Bertucci P, Franzo L, Massoud R, Cortese C, Lala A and Federici G. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2006**; 842(1): 43-7.

- Alrefai WA**, Annaba F, Sarwar Z, Dwivedi A, Saksena S, Singla A, Dudeja PK and Gill RK. Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2007**; 292(1): G369-76.
- Altmann SW**, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N and Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* **2004**; 303(5661): 1201-4.
- Anderson RA**, Joyce C, Davis M, Reagan JW, Clark M, Shelness GS and Rudel LL. Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol Chem.* **1998**; 273(41): 26747-54.
- Andersson SW**, Skinner J, Ellegard L, Welch AA, Bingham S, Mulligan A, Andersson H and Khaw KT. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr.* **2004**; 58(10): 1378-85.
- Ando M**, Tomoyori H and Imaizumi K. Dietary cholesterol-oxidation products accumulate in serum and liver in apolipoprotein E-deficient mice, but do not accelerate atherosclerosis. *Br J Nutr.* **2002**; 88(4): 339-45.
- Armand M**, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Lafont H and Lairon D. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol.* **1994**; 266(3 Pt 1): G372-81.
- Armand M**, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J and Lairon D. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol.* **1996**; 271(1 Pt 1): G172-83.
- Assmann G**, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F and Schulte H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **2006**; 16(1): 13-21.
- Assmann G** and Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med.* **2003**; 54: 321-41.
- Assmann G**, Schmitz G, Menzel HJ and Schulte H. Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia. *Clin Chem.* **1984**; 30(5): 641-3.

B

- Bakillah A**, Nayak N, Saxena U, Medford RM and Hussain MM. Decreased secretion of ApoB follows inhibition of ApoB-MTP binding by a novel antagonist. *Biochemistry*. **2000**; 39(16): 4892-9.
- Beaumier-Gallon G**, Dubois C, Portugal H and Lairon D. Postprandial studies on dietary cholesterol in human subjects using stable isotopes and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Atherosclerosis*. **1998a**; 141 Suppl 1: S81-5.
- Beaumier-Gallon G**, Dubois C, Senft M, Vergnes MF, Pauli AM, Portugal H and Lairon D. Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. **2001**; 73(5): 870-877.
- Beaumier-Gallon G**, Lanfranchi J, Vergnes MF, Lairon D, Pastor J, Pauli AM and Portugal H. Method for simultaneous measurements of traces of heptadeuterated cholesterol and cholesterol by gas chromatography-mass spectrometry: application in humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. **1998b**; 718(1): 23-32.
- Bennion LJ** and Grundy SM. Effects of obesity and caloric intake on biliary lipid metabolism in man. *J Clin Invest*. **1975**; 56(4): 996-1011.
- Berge KE**, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R and Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. **2000**; 290(5497): 1771-5.
- Berge KE**, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH and Cohen JC. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res*. **2002**; 43(3): 486-94.
- Bettters JL** and Yu L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett*. **2010**; 584(13): 2740-7.
- Beylot M**. The use of stable isotopes and mass spectrometry in studying lipid metabolism. *Proc Nutr Soc*. **1994**; 53(2): 355-62.
- Bietrix F**, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F and Collet X. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem*. **2006**; 281(11): 7214-9.
- Binnert C**, Laville M, Pachiardi C, Rigalleau V and Beylot M. Use of gas chromatography/isotope ratio-mass spectrometry to study triglyceride metabolism in humans. *Lipids*. **1995**; 30(9): 869-73.

- Bjorn L**, Leren TP, Ose L, Hamsten A and Karpe F. A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP -493G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000**; 20(7): 1784-1788.
- Black DD**. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2007**; 293(3): G519-24.
- Borgstrom B**. Quantification of cholesterol absorption in man by fecal analysis after the feeding of a single isotope-labeled meal. *J Lipid Res.* **1969**; 10(3): 331-7.
- Bosner MS**, Lange LG, Stenson WF and Ostlund RE, Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res.* **1999**; 40(2): 302-8.
- Bosner MS**, Ostlund RE, Jr., Osofisan O, Grosklos J, Fritschle C and Lange LG. Assessment of percent cholesterol absorption in humans with stable isotopes. *J Lipid Res.* **1993**; 34(6): 1047-53.
- Brown AJ** and Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **1999a**; 142(1): 1-28.
- Brown AJ** and Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med.* **2009**; 30(3): 111-22.
- Brown JM**, Rudel LL and Yu L. NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) mediates sterol-specific unidirectional transport of non-esterified cholesterol in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Biochem J.* **2007**; 406(2): 273-83.
- Brown ML**, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA and Gianturco SH. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97(13): 7488-93.
- Brown MS** and Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999b**; 96(20): 11041-8.
- Brown MS**, Kovanen PT and Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science.* **1981**; 212(4495): 628-35.
- Brunham LR**, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F and Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* **2006**; 116(4): 1052-62.

Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S and Farese RV, Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med.* **2000**; 6(12): 1341-7.

C

Cai L, Eckhardt ER, Shi W, Zhao Z, Nasser M, de Villiers WJ and van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* **2004**; 45(2): 253-62.

Cai SF, Kirby RJ, Howles PN and Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res.* **2001**; 42(6): 902-9.

Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC and Blanco-Vaca F. Phytosterol-mediated inhibition of intestinal cholesterol absorption is independent of ATP-binding cassette transporter A1. *Br J Nutr.* **2006**; 95(3): 618-22.

Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC and Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis.* **2009**; 203(1): 18-31.

Calvo D and Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem.* **1993**; 268(25): 18929-35.

Carey MC and Small DM. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Am J Med.* **1970**; 49: 590-608.

Cartwright IJ and Higgins JA. Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *J Biol Chem.* **2001**; 276(51): 48048-57.

Cases S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusis AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK and Farese RV, Jr. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem.* **1998**; 273(41): 26755-64.

Chan DC, Watts GF, Barrett PH, O'Neill FH and Thompson GR. Plasma markers of cholesterol homeostasis and apolipoprotein B-100 kinetics in the metabolic syndrome. *Obes Res.* **2003**; 11(4): 591-6.

- Chan YM**, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J and Jones PJ. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev.* **2006**; 64(9): 385-402.
- Chandler CE**, Wilder DE, Pettini JL, Savoy YE, Petras SF, Chang G, Vincent J and Harwood HJ, Jr. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *J Lipid Res.* **2003**; 44(10): 1887-901.
- Chang CC**, Huh HY, Cadigan KM and Chang TY. Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **1993**; 268(28): 20747-55.
- Chardon L**, Sassolas A, Dingeon B, Michel-Calemard L, Bovier-Lapierre M, Moulin P and Lachaux A. Identification of two novel mutations and long-term follow-up in abetalipoproteinemia: a report of four cases. *Eur J Pediatr.* **2009**; 168(8): 983-9.
- Clifton PM**, Noakes M, Sullivan D, Erichsen N, Ross D, Annison G, Fassoulakis A, Cehun M and Nestel P. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur J Clin Nutr.* **2004**; 58(3): 503-9.
- Cofan M**, Escurriol V, Garcia-Otin AL, Moreno-Iribas C, Larranaga N, Sanchez MJ, Tormo MJ, Redondo ML, Gonzalez CA, Corella D, Pocovi M, Civeira F and Ros E. Association of plasma markers of cholesterol homeostasis with metabolic syndrome components. A cross-sectional study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **2010**; [Epub ahead of print]. doi:10.1016/j.numecd.2010.01.005.
- Cohen JC**, Pertsemlidis A, Fahmi S, Esmail S, Vega GL, Grundy SM and Hobbs HH. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**; 103(6): 1810-1815.
- Corella D**, Portoles O, Arriola L, Chirlaque MD, Barricarte A, Frances F, Huerta JM, Larranaga N, Martinez C, Martinez-Cambor P, Molina E, Navarro C, Quiros JR, Rodriguez L, Sanchez MJ, Ros E, Sala N, Gonzalez CA and Moreno-Iribas C. Saturated fat intake and alcohol consumption modulate the association between the APOE polymorphism and risk of future coronary heart disease: a nested case-control study in the Spanish EPIC cohort. *J Nutr Biochem.* **2010**; [Epub ahead of print].
- Couture P**, Otvos JD, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ and Ordovas JM. Absence of association between genetic variation in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein gene and plasma lipoproteins in the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis.* **2000**; 148(2): 337-343.

D

- Daskalopoulou SS** and Mikhailidis DP. Reaching goal in hypercholesterolaemia: dual inhibition of cholesterol synthesis and absorption with simvastatin plus ezetimibe. *Curr Med Res Opin.* **2006**; 22(3): 511-28.
- Davies JP**, Scott C, Oishi K, Liapis A and Ioannou YA. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* **2005**; 280(13): 12710-20.
- Davis HR** and Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta.* **2009**; 1791(7): 679-83.
- Davis HR**, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP and Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* **2004**; 279(32): 33586-92.
- Davis RA**, Thrift RN, Wu CC and Howell KE. Apolipoprotein B is both integrated into and translocated across the endoplasmic reticulum membrane. Evidence for two functionally distinct pools. *J Biol Chem.* **1990**; 265(17): 10005-11.
- Dawson PA**, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N and Parks JS. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem.* **2003**; 278(36): 33920-7.
- Drobnik W**, Lindenthal B, Lieser B, Ritter M, Christiansen Weber T, Liebisch G, Giesa U, Igel M, Borsukova H, Buchler C, Fung-Leung WP, Von Bergmann K and Schmitz G. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology.* **2001**; 120(5): 1203-11.
- Duan LP**, Wang HH, Ohashi A and Wang DQ. Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2006**; 290(2): G269-76.
- Duan LP**, Wang HH and Wang DQ. Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. *J Lipid Res.* **2004**; 45(7): 1312-23.
- Durrington PN**, Mackness B and Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2001**; 21(4): 473-80.

Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, Staels B and Lestavel S. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* **2006**; 340(4): 1259-63.

E

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P and Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* **2004**; 86(11): 839-48.

Escuriol V, Cofan M, Serra M, Bullo M, Basora J, Salas-Salvado J, Corella D, Zazpe I, Martinez-Gonzalez MA, Ruiz-Gutierrez V, Estruch R and Ros E. Serum sterol responses to increasing plant sterol intake from natural foods in the Mediterranean diet. *European journal of nutrition.* **2009**; 48(6): 373-382.

F

Fahmi S, Yang C, Esmail S, Hobbs HH and Cohen JC. Functional characterization of genetic variants in NPC1L1 supports the sequencing extremes strategy to identify complex trait genes. *Hum Mol Genet.* **2008**; 17(14): 2101-7.

Fassbender K, Lutjohann D, Dik MG, Bremmer M, Konig J, Walter S, Liu Y, Letiembre M, von Bergmann K and Jonker C. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk--the LASA study. *Atherosclerosis.* **2008**; 196(1): 283-8.

Fernandez CA, Des Rosiers C, Previs SF, David F and Brunengraber H. Correction of ¹³C mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance. *J Mass Spectrom.* **1996**; 31(3): 255-62.

Fernandez ML. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol.* **2001**; 12(1): 35-40.

Field FJ, Born E and Mathur SN. Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* **1997**; 38(2): 348-60.

Field FJ, Born E and Mathur SN. LXR/RXR ligand activation enhances basolateral efflux of beta-sitosterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* **2004**; 45(5): 905-13.

- Field FJ**, Kam NT and Mathur SN. Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterology*. **1990**; 99(2): 539-51.
- Field FJ** and Mathur SN. beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J Lipid Res*. **1983**; 24(4): 409-17.
- Field FJ**, Watt K and Mathur SN. Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J Lipid Res*. **2007**; 48(8): 1735-45.

G

- Galman C**, Ostlund-Lindqvist AM, Bjorquist A, Schreyer S, Svensson L, Angelin B and Rudling M. Pharmacological interference with intestinal bile acid transport reduces plasma cholesterol in LDL receptor/apoE deficiency. *FASEB J*. **2003**; 17(2): 265-7.
- Garcia-Calvo M**, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR, Jr., Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill K A, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT and Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**; 102(23): 8132-7.
- Gastaldi M**, Diziere S, Defoort C, Portugal H, Lairon D, Darmon M and Planells R. Sex-specific association of fatty acid binding protein 2 and microsomal triacylglycerol transfer protein variants with response to dietary lipid changes in the 3-mo Medi-RIVAGE primary intervention study. *Am J Clin Nutr*. **2007**; 86(6): 1633-1641.
- Ge L**, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, Li BL and Song BL. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab*. **2008**; 7(6): 508-19.
- Ginsberg HN**, Karmally W, Siddiqui M, Holleran S, Tall AR, Rumsey SC, Deckelbaum RJ, Blaner WS and Ramakrishnan R. A dose-response study of the effects of dietary cholesterol on fasting and postprandial lipid and lipoprotein metabolism in healthy young men. *Arterioscler Thromb*. **1994**; 14(4): 576-86.

- Glueck CJ**, Speirs J, Tracy T, Streicher P, Illig E and Vandegrift J. Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives. *Metabolism*. **1991**; 40(8): 842-8.
- Goldberg IJ**, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U and Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem*. **1990**; 265(8): 4266-72.
- Graf GA**, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC and Hobbs HH. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. **2002**; 110(5): 659-69.
- Gremaud G**, Piguet C, Baumgartner M, Pouteau E, Decarli B, Berger A and Fay LB. Simultaneous assessment of cholesterol absorption and synthesis in humans using on-line gas chromatography/ combustion and gas chromatography/pyrolysis/isotope-ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **2001**; 15(14): 1207-13.
- Grundy SM** and Ahrens EH, Jr. Measurements of cholesterol turnover, synthesis, and absorption in man, carried out by isotope kinetic and sterol balance methods. *J Lipid Res*. **1969**; 10(1): 91-107.
- Grundy SM**, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Jr., Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Jr. and Stone NJ. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2004**; 24(8): e149-61.
- Grundy SM** and Mok HY. Determination of cholesterol absorption in man by intestinal perfusion. *J Lipid Res*. **1977**; 18(2): 263-71.
- Gylling H**, Hallikainen M, Kolehmainen M, Toppinen L, Pihlajamaki J, Mykkanen H, Agren JJ, Rauramaa R, Laakso M and Miettinen TA. Cholesterol synthesis prevails over absorption in metabolic syndrome. *Transl Res*. **2007**; 149(6): 310-6.
- Gylling H**, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R and Miettinen TA. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res*. **2004**; 45(9): 1660-5.
- Gylling H**, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Simonen P, Kuusisto J, Laakso M and Miettinen TA. Insulin sensitivity regulates cholesterol metabolism to a greater extent than obesity: lessons from the METSIM Study. *J Lipid Res*. **2010**; 51(8): 2422-7.

Gylling H, Strandberg T, Tilvis R and Miettinen TA. Regulation of serum cholesterol level in middle-aged and elderly men. Relation of cholesterol absorption and synthesis to lipoprotein metabolism. *Arterioscler Thromb.* **1994**; 14(5): 694-700.

H

Hagan DL, Kienzle B, Jamil H and Hariharan N. Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem.* **1994**; 269(46): 28737-44.

Hallikainen M, Vidgren H, Agren JJ, Kiviniemi V, Miettinen TA and Gylling H. Postprandial behavior of plasma squalene and non-cholesterol sterols in men with varying cholesterol absorption. *Clin Chim Acta.* **2006**; 374(1-2): 63-8.

Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Gylling H, Erkkila AT and Uusitupa MI. Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr.* **2000**; 54(9): 715-25.

Hauser H, Dyer JH, Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G and Phillips MC. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry.* **1998**; 37(51): 17843-50.

Hazard SE and Patel SB. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch.* **2007**; 453(5): 745-52.

Heidrich JE, Contos LM, Hunsaker LA, Deck LM and Vander Jagt DL. Inhibition of pancreatic cholesterol esterase reduces cholesterol absorption in the hamster. *BMC Pharmacol.* **2004**; 4: 5.

Hernell O, Stammers JE and Carey MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry.* **1990**; 29(8): 2041-56.

- Herrmann SM**, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Arveiler D, Bao-Sheng C and Cambien F. Identification of two polymorphisms in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene: lack of association with lipoprotein profiles. *J Lipid Res.* **1998**; 39(12): 2432-5.
- Herron KL**, Vega-Lopez S, Conde K, Ramjiganesh T, Roy S, Shachter NS and Fernandez ML. Pre-menopausal women, classified as hypo- or hyperresponders, do not alter their LDL/HDL ratio following a high dietary cholesterol challenge. *J Am Coll Nutr.* **2002**; 21(3): 250-8.
- Hiramitsu S**, Ishiguro Y, Matsuyama H, Yamada K, Kato K, Noba M, Uemura A, Yoshida S, Matsubara Y, Kani A, Hasegawa K, Hishida H and Ozaki Y. The effects of ezetimibe on surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis in Japanese patients with dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* **2010**; 17(1): 106-14.
- Hoening MR**, Rolfe BE and Campbell JH. Cholestanol: a serum marker to guide LDL cholesterol-lowering therapy. *Atherosclerosis.* **2006**; 184(2): 247-54.
- Hoffman HN** and Fredrickson DS. Tangier disease (familial high density lipoprotein deficiency). Clinical and genetic features in two adults. *Am J Med.* **1965**; 39(4): 582-93.
- Hopkins PN**. Effects of dietary cholesterol on serum cholesterol: a meta-analysis and review. *Am J Clin Nutr.* **1992**; 55(6): 1060-70.
- Hou R** and Goldberg AC. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **2009**; 38(1): 79-97.
- Houweling AH**, Vanstone CA, Trautwein EA, Duchateau GS and Jones PJ. Baseline plasma plant sterol concentrations do not predict changes in serum lipids, C-reactive protein (CRP) and plasma plant sterols following intake of a plant sterol-enriched food. *Eur J Clin Nutr.* **2009**; 63(4): 543-51.
- Huff MW**. Dietary cholesterol, cholesterol absorption, postprandial lipemia and atherosclerosis. *Can J Clin Pharmacol.* **2003**; 10 Suppl A: 26A-32A.
- Huff MW**, Pollex RL and Hegele RA. NPC1L1: evolution from pharmacological target to physiological sterol transporter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2006**; 26(11): 2433-8.
- Huggins KW**, Camarota LM, Howles PN and Hui DY. Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. *J Biol Chem.* **2003**; 278(44): 42899-905.

- Hui DY**, Labonte ED and Howles PN. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2008**; 294(4): G839-43.
- Hussain MM**. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis.* **2000**; 148(1): 1-15.
- Hussain MM** and Bakillah A. New approaches to target microsomal triglyceride transfer protein. *Curr Opin Lipidol.* **2008**; 19(6): 572-8.
- Hussain MM**, Fatma S, Pan X and Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol.* **2005**; 16(3): 281-5.
- Hussain MM**, Iqbal J, Anwar K, Rava P and Dai K. Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein. *Front Biosci.* **2003a**; 8: s500-6.
- Hussain MM**, Kedees MH, Singh K, Athar H and Jamali NZ. Signposts in the assembly of chylomicrons. *Front Biosci.* **2001**; 6: D320-31.
- Hussain MM**, Shi J and Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* **2003b**; 44(1): 22-32.

I

- Ichihashi T**, Izawa M, Miyata K, Mizui T, Hirano K and Takagishi Y. Mechanism of hypocholesterolemic action of S-8921 in rats: S-8921 inhibits ileal bile acid absorption. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998**; 284(1): 43-50.
- Ikeda I**, Tanabe Y and Sugano M. Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **1989**; 35(4): 361-9.
- Iqbal J**, Anwar K and Hussain MM. Multiple, independently regulated pathways of cholesterol transport across the intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* **2003**; 278(34): 31610-20.
- Iqbal J**, Dai K, Seimon T, Jungreis R, Oyadomari M, Kuriakose G, Ron D, Tabas I and Hussain MM. IRE1beta inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metab.* **2008a**; 7(5): 445-55.
- Iqbal J** and Hussain MM. Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. *J Lipid Res.* **2005**; 46(7): 1491-501.
- Iqbal J** and Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2009**; 296(6): E1183-94.

- Iqbal J**, Rudel LL and Hussain MM. Microsomal triglyceride transfer protein enhances cellular cholesteryl esterification by relieving product inhibition. *J Biol Chem.* **2008b**; 283(29): 19967-80.
- Iyer SP**, Yao X, Crona JH, Hoos LM, Tetzloff G, Davis HR, Jr., Graziano MP and Altmann SW. Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein. *Biochim Biophys Acta.* **2005**; 1722(3): 282-92.
- Izzat NN**, Deshazer ME and Loose-Mitchell DS. New molecular targets for cholesterol-lowering therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* **2000**; 293(2): 315-20.

J

- Jakulj L**, Vissers MN, Groen AK, Hutten BA, Lutjohann D, Veltri EP and Kastelein JJ. Baseline cholesterol absorption and the response to ezetimibe/simvastatin therapy: a post-hoc analysis of the ENHANCE trial. *J Lipid Res.* **2010a**; 51(4): 755-62.
- Jakulj L**, Vissers MN, Tanck MW, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJ and Dallinga-Thie GM. ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. *J Lipid Res.* **2010b**; 51(10): 3016-23.
- Jennings ME**, 2nd and Matthews DE. Determination of complex isotopomer patterns in isotopically labeled compounds by mass spectrometry. *Anal Chem.* **2005**; 77(19): 6435-44.
- Jones PJ** and Leatherdale ST. Stable isotopes in clinical research: safety reaffirmed. *Clin Sci (Lond).* **1991**; 80(4): 277-80.
- Jones PJ**, Pappu AS, Hatcher L, Li ZC, Illingworth DR and Connor WE. Dietary cholesterol feeding suppresses human cholesterol synthesis measured by deuterium incorporation and urinary mevalonic acid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1996**; 16(10): 1222-8.
- Jones PJ**, Pencharz PB and Clandinin MT. Absorption of ¹³C-labeled stearic, oleic, and linoleic acids in humans: application to breath tests. *J Lab Clin Med.* **1985**; 105(6): 647-52.
- Jones PJ**, Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Feng JY and Parsons WE. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res.* **2000**; 41(5): 697-705.

Juo SH, Han Z, Smith JD, Colangelo L and Liu K. Common polymorphism in promoter of microsomal triglyceride transfer protein gene influences cholesterol, ApoB, and triglyceride levels in young african american men: results from the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000**; 20(5): 1316-22.

K

Karpe F, Lundahl B, Ehrenborg E, Eriksson P and Hamsten A. A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1998**; 18(5): 756-61.

Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T and Paoletti R. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc.* **2003**; 78(8): 965-78.

Kempen HJ, de Knijff P, Boomsma DI, van der Voort HA, Gevers Leuven JA and Havekes L. Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism.* **1991**; 40(6): 604-11.

Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA and Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res.* **1988**; 29(9): 1149-55.

Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N and Edwards PA. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem.* **2001**; 276(42): 39438-47.

Kesaniemi YA, Ehnholm C and Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *J Clin Invest.* **1987**; 80(2): 578-81.

Kirby RJ, Zheng S, Tso P, Howles PN and Hui DY. Bile salt-stimulated carboxyl ester lipase influences lipoprotein assembly and secretion in intestine: a process mediated via ceramide hydrolysis. *J Biol Chem.* **2002**; 277(6): 4104-9.

Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD and Patel SB. Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol.* **2004a**; 4: 21.

- Klett EL**, Lu K, Kosters A, Vink E, Lee MH, Altenburg M, Shefer S, Batta AK, Yu H, Chen J, Klein R, Looije N, Oude-Elferink R, Groen AK, Maeda N, Salen G and Patel SB. A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med.* **2004b**; 2: 5.
- Knopp RH**. Cardiovascular effects of endogenous and exogenous sex hormones over a woman's lifetime. *Am J Obstet Gynecol.* **1988**; 158(6 Pt 2): 1630-43.
- Knopp RH**, Gitter H, Truitt T, Bays H, Manion CV, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Yang B and Veltri EP. Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia. *Eur Heart J.* **2003**; 24(8): 729-41.
- Kruit JK**, Plosch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PH, Groen AK and Kuipers F. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology.* **2005**; 128(1): 147-56.
- Kuksis A**. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A.* **2001**; 935(1-2): 203-36.

L

- Lairon D**. Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atheroscler Suppl.* **2008**; 9(2): 45-8.
- Lammert F** and Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology.* **2005**; 129(2): 718-34.
- Lee MH**, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M and Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet.* **2001**; 27(1): 79-83.
- Lee WN**, Byerley LO, Bergner EA and Edmond J. Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. *Biol Mass Spectrom.* **1991**; 20(8): 451-8.
- Levy E**, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M and Lavoie MA. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol.* **2007**; 18(3): 310-8.
- Levy E**, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G and Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem.* **2002**; 277(19): 16470-7.

- Lewis GF** and Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* **2005**; 96(12): 1221-32.
- Lin DS** and Connor WE. The long term effects of dietary cholesterol upon the plasma lipids, lipoproteins, cholesterol absorption, and the sterol balance in man: the demonstration of feedback inhibition of cholesterol biosynthesis and increased bile acid excretion. *J Lipid Res.* **1980**; 21(8): 1042-52.
- Lin MC**, Gordon D and Wetterau JR. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res.* **1995**; 36(5): 1073-81.
- Lindquist S** and Hernell O. Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **2010**; 13(3): 314-20.
- Lombardo D**, Fauvel J and Guy O. Studies on the substrate specificity of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. I. Action on carboxyl esters, glycerides and phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* **1980a**; 611(1): 136-46.
- Lombardo D** and Guy O. Studies on the substrate specificity of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. II. Action on cholesterol esters and lipid-soluble vitamin esters. *Biochim Biophys Acta.* **1980b**; 611(1): 147-55.
- Lu S**, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, Gallagher JW, Shelness GS, Morris GS, Mahan J, Frase S, Mansbach CM, Weinberg RB and Black DD. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem.* **2006**; 281(6): 3473-83.
- Lu S**, Yao Y, Meng S, Cheng X and Black DD. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid transport in newborn swine intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* **2002**; 277(35): 31929-37.
- Lundahl B**, Skoglund-Andersson C, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Hamsten A, Packard CJ and Karpe F. Microsomal triglyceride transfer protein -493T variant reduces IDL plus LDL apoB production and the plasma concentration of large LDL particles. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2006**; 290(4): E739-45.
- Lutjohann D**, Bjorkhem I, Beil UF and von Bergmann K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res.* **1995**; 36(8): 1763-73.
- Lutjohann D**, Meese CO, Crouse JR, 3rd and von Bergmann K. Evaluation of deuterated cholesterol and deuterated sitostanol for measurement of cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res.* **1993**; 34(6): 1039-46.

M

- Maeda T**, Honda A, Ishikawa T, Kinoshita M, Mashimo Y, Takeoka Y, Yasuda D, Kusano J, Tsukamoto K, Matsuzaki Y and Teramoto T. A SNP of NPC1L1 affects cholesterol absorption in Japanese. *J Atheroscler Thromb.* **2010**; 17(4): 356-60.
- Marangoni F** and Poli A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res.* **2010**; 61(3): 193-9.
- Marcus SN** and Heaton KW. Intestinal transit, deoxycholic acid and the cholesterol saturation of bile--three inter-related factors. *Gut.* **1986**; 27(5): 550-8.
- Mardones P**, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE and Rigotti A. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res.* **2001**; 42(2): 170-80.
- Martinez-Gonzalez MA** and Sanchez-Villegas A. The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *Eur J Epidemiol.* **2004**; 19(1): 9-13.
- Mathers CD**, Boerma T and Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull.* **2009**; 92: 7-32.
- Matthan NR**, Jalbert SM, Lamon-Fava S, Dolnikowski GG, Welty FK, Barrett HR, Schaefer EJ and Lichtenstein AH. TRL, IDL, and LDL apolipoprotein B-100 and HDL apolipoprotein A-I kinetics as a function of age and menopausal status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005**; 25(8): 1691-6.
- Matthan NR** and Lichtenstein AH. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis.* **2004**; 174(2): 197-205.
- Matthan NR**, Pencina M, Larocque JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Schaefer EJ and Lichtenstein AH. Alterations in cholesterol absorption and synthesis characterize Framingham offspring study participants with coronary heart disease. *J Lipid Res.* **2009**.
- McMurry MP**, Connor WE, Lin DS, Cerqueira MT and Connor SL. The absorption of cholesterol and the sterol balance in the Tarahumara Indians of Mexico fed cholesterol-free and high cholesterol diets. *Am J Clin Nutr.* **1985**; 41(6): 1289-98.
- McNamara D**. Cholesterol intake and plasma cholesterol: an update. *J Am Coll Nutr.* **1997**; 16(6): 530-4.

- McNamara DJ.** Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* **2000**; 1529(1-3): 310-20.
- McNamara DJ,** Davidson NO, Samuel P and Ahrens EH, Jr. Cholesterol absorption in man: effect of administration of clofibrate and/or cholestyramine. *J Lipid Res.* **1980**; 21(8): 1058-64.
- McNamara DJ,** Kolb R, Parker TS, Batwin H, Samuel P, Brown CD and Ahrens EH, Jr. Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *J Clin Invest.* **1987**; 79(6): 1729-39.
- McNeish J,** Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G and Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97(8): 4245-50.
- Medina RA,** Aranda E, Verdugo C, Kato S and Owen GI. The action of ovarian hormones in cardiovascular disease. *Biol Res.* **2003**; 36(3-4): 325-41.
- Miettinen TA.** Cholesterol production in obesity. *Circulation.* **1971**; 44(5): 842-50.
- Miettinen TA** and Gylling H. Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis.* **2000a**; 153(1): 241-8.
- Miettinen TA** and Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. *Eur J Clin Invest.* **2003**; 33(11): 976-82.
- Miettinen TA** and Gylling H. Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases: a review. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **2006**; 44(6): 247-50.
- Miettinen TA,** Gylling H, Strandberg T and Sarna S. Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S Investigators. *BMJ.* **1998**; 316(7138): 1127-30.
- Miettinen TA,** Gylling H, Tuominen J, Simonen P and Koivisto V. Low synthesis and high absorption of cholesterol characterize type 1 diabetes. *Diabetes Care.* **2004**; 27(1): 53-8.
- Miettinen TA,** Gylling H, Vanhanen H and Ollus A. Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arterioscler Thromb.* **1992**; 12(9): 1044-52.
- Miettinen TA** and Kesaniemi YA. Cholesterol absorption: regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels. *Am J Clin Nutr.* **1989a**; 49(4): 629-35.

- Miettinen TA**, Puska P, Gylling H, Vanhanen H and Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N Engl J Med.* **1995**; 333(20): 1308-12.
- Miettinen TA**, Railo M, Lepantalo M and Gylling H. Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Am Coll Cardiol.* **2005**; 45(11): 1794-801.
- Miettinen TA**, Strandberg TE and Gylling H. Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients: relation to basal serum cholestanol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000b**; 20(5): 1340-6.
- Miettinen TA**, Tilvis RS and Kesaniemi YA. Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism.* **1989b**; 38(2): 136-40.
- Miettinen TA**, Tilvis RS and Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol.* **1990**; 131(1): 20-31.
- Mikhailidis DP**, Sibbring GC, Ballantyne CM, Davies GM and Catapano AL. Meta-analysis of the cholesterol-lowering effect of ezetimibe added to ongoing statin therapy. *Curr Med Res Opin.* **2007**; 23(8): 2009-26.
- Minckus M**, Jelier M, Xiao JZ, Kondo S, Iwatsuki K, Kokubo S, Bos M, Dunnewind B and Havenaar R. Effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the bioaccessibility of fat and cholesterol. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2005**; 69(5): 932-8.
- Mistry P**, Miller NE, Laker M, Hazzard WR and Lewis B. Individual variation in the effects of dietary cholesterol on plasma lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis in man. Studies of low density lipoprotein receptor activity and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* **1981**; 67(2): 493-502.
- Mittendorfer B**, Ostlund RE, Jr., Patterson BW and Klein S. Orlistat inhibits dietary cholesterol absorption. *Obes Res.* **2001**; 9(10): 599-604.
- Morabia A**, Ross BM, Costanza MC, Cayanis E, Flaherty MS, Alvin GB, Das K, James R, Yang AS, Evagrafov O and Gilliam TC. Population-based study of SR-BI genetic variation and lipid profile. *Atherosclerosis.* **2004**; 175(1): 159-68.
- Moreau RA**, Whitaker BD and Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res.* **2002**; 41(6): 457-500.

- Morel E**, Demignot S, Chateau D, Chambaz J, Rousset M and Delers F. Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell*. **2004**; 15(1): 132-41.
- Mulligan JD**, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR and Attie AD. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem*. **2003**; 278(15): 13356-66.

N

- Nassir F**, Wilson B, Han X, Gross RW and Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem*. **2007**; 282(27): 19493-501.
- Nauli AM**, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA and Tso P. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*. **2006**; 131(4): 1197-207.
- Navab M**, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC and Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*. **2000**; 41(9): 1495-508.
- NCEP**. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*. **2002**; 106(25): 3143-3421.
- Nguyen DV**, Drover VA, Knopfel M, Dhanasekaran P, Hauser H and Phillips MC. Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *J Lipid Res*. **2009**; 50(11): 2235-44.
- Nissinen MJ**, Gylling H and Miettinen TA. Effects of dietary cholesterol and fat on serum non-cholesterol sterols according to different apolipoprotein E subgroups among healthy men. *Br J Nutr*. **2008a**; 100(2): 373-9.
- Nissinen MJ**, Gylling H and Miettinen TA. Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr*. **2008b**; 99(2): 370-8.

O

- O'Connell BJ** and Genest J, Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation*. **2001**; 104(16): 1978-83.
- Ostlund RE, Jr.** Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*. **2002**; 22: 533-49.
- Ostlund RE, Jr.**, Bosner MS and Stenson WF. Cholesterol absorption efficiency declines at moderate dietary doses in normal human subjects. *J Lipid Res*. **1999**; 40(8): 1453-8.
- Ostlund RE, Jr.**, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF and Spilburg CA. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2002a**; 282(4): E911-6.
- Ostlund RE, Jr.**, Racette SB and Stenson WF. Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterols, oxysterols, and squalene. *Nutr Rev*. **2002b**; 60(11): 349-59.

P

- Panagiotakos DB**, Pitsavos C, Polychronopoulos E, Chrysohoou C, Zampelas A and Trichopoulou A. Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Med Sci Monit*. **2004**; 10(8): RA193-8.
- Pandor A**, Ara RM, Tumur I, Wilkinson AJ, Paisley S, Duenas A, Durrington PN and Chilcott J. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Intern Med*. **2009**; 265(5): 568-80.
- Patel MD** and Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*. **2006**; 186(1): 12-9.
- Peet DJ**, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE and Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. **1998**; 93(5): 693-704.

- Peretti N**, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, Pignet-Chardon L, Moulin P, Labarge S, Bouthillier L, Lachaux A and Levy E. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis.* **2010**; 5: 24.
- Perez-Martinez P**, Ordovas JM, Lopez-Miranda J, Gomez P, Marin C, Moreno J, Fuentes F, Fernandez de la Puebla RA and Perez-Jimenez F. Polymorphism exon 1 variant at the locus of the scavenger receptor class B type I gene: influence on plasma LDL cholesterol in healthy subjects during the consumption of diets with different fat contents. *Am J Clin Nutr.* **2003**; 77(4): 809-13.
- Phillips KM**, Ruggio DM and Bailey JA. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1999**; 732(1): 17-29.
- Pinedo S**, Vissers MN, von Bergmann K, Elharchaoui K, Lutjohann D, Luben R, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT and Boekholdt SM. Plasma levels of plant sterols and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J Lipid Res.* **2007**; 48(1): 139-44.
- Plat J**, Bragt MC and Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res.* **2005a**; 46(1): 68-75.
- Plat J** and Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol.* **2005b**; 96(1A): 15D-22D.
- Plosch T**, Bloks VW, Terasawa Y, Berdy S, Siegler K, Van Der Sluijs F, Kema IP, Groen AK, Shan B, Kuipers F and Schwarz M. Sitosterolemia in ABC-transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor. *Gastroenterology.* **2004**; 126(1): 290-300.
- Plosch T**, Kok T, Bloks VW, Smit MJ, Havinga R, Chimini G, Groen AK and Kuipers F. Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J Biol Chem.* **2002**; 277(37): 33870-7.
- Ponz de Leon M**, Iori R, Barbolini G, Pompei G, Zaniol P and Carulli N. Influence of small-bowel transit time on dietary cholesterol absorption in human beings. *N Engl J Med.* **1982**; 307(2): 102-3.
- Ponz de Leon M**, Loria P, Iori R and Carulli N. Cholesterol absorption in cirrhosis: the role of total and individual bile acid pool size. *Gastroenterology.* **1981**; 80(6): 1428-37.

Pouteau E, Piguët-Welsch C, Berger A and Fay LB. Determination of cholesterol absorption in humans: from radiolabel to stable isotope studies. *Isotopes Environ Health Stud.* **2003**; 39(4): 247-57.

Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hammerle G and Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol.* **2002**; 13(5): 471-81.

Q

Quintao E, Grundy SM and Ahrens EH, Jr. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res.* **1971**; 12(2): 233-47.

R

Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL and Young SG. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**; 95(15): 8686-91.

Rader DJ, Cohen J and Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* **2003**; 111(12): 1795-803.

Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffle P and Brewer HB, Jr. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**; 96(22): 12685-90.

Repa JJ, Buhman KK, Farese RV, Jr., Dietschy JM and Turley SD. ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology.* **2004**; 40(5): 1088-97.

- Repa JJ**, Lund EG, Horton JD, Leitersdorf E, Russell DW, Dietschy JM and Turley SD. Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem.* **2000a**; 275(50): 39685-92.
- Repa JJ**, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM and Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* **2000b**; 289(5484): 1524-9.
- Richelle M**, Enslen M, Hager C, Groux M, Tavazzi I, Godin JP, Berger A, Metairon S, Quaile S, Piguet-Welsch C, Sagalowicz L, Green H and Fay LB. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am J Clin Nutr.* **2004**; 80(1): 171-7.
- Rideout TC**, Harding SV, Jones PJ and Fan MZ. Guar gum and similar soluble fibers in the regulation of cholesterol metabolism: current understandings and future research priorities. *Vasc Health Risk Manag.* **2008**; 4(5): 1023-33.
- Ros E**. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* **2000**; 151(2): 357-79.
- Rosenblatt J**, Chinkes D, Wolfe M and Wolfe RR. Stable isotope tracer analysis by GC-MS, including quantification of isotopomer effects. *Am J Physiol.* **1992**; 263(3 Pt 1): E584-96.
- Rudel LL**, Lee RG and Parini P. ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005**; 25(6): 1112-8.
- Rust S**, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P and Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* **1999**; 22(4): 352-5.

S

- Sakamoto S**, Kusuhara H, Miyata K, Shimaoka H, Kanazu T, Matsuo Y, Nomura K, Okamura N, Hara S, Horie K, Baba T and Sugiyama Y. Glucuronidation converting methyl 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(3-ethylvaleryl)-4-hydroxy-6,7,8-trimethoxy-2-na phthoate (S-8921) to a potent apical sodium-dependent bile acid transporter inhibitor, resulting in a hypocholesterolemic action. *J Pharmacol Exp Ther.* **2007**; 322(2): 610-8.

- Salen G**, Ahrens EH, Jr. and Grundy SM. Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest.* **1970**; 49(5): 952-67.
- Salen G**, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS and Shore V. Sitosterolemia. *J Lipid Res.* **1992**; 33(7): 945-55.
- Salen G**, von Bergmann K, Lutjohann D, Kwiterovich P, Kane J, Patel SB, Musliner T, Stein P and Musser B. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation.* **2004**; 109(8): 966-71.
- Samuel P**, McNamara DJ, Ahrens EH, Jr., Crouse JR and Parker T. Further validation of the plasma isotope ratio method for measurement of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res.* **1982**; 23(3): 480-9.
- Sanclemente T**, Marques-Lopes I, Fajo-Pascual M, Cofan M, Jarauta E, Ros E, Puzo J and Garcia-Otin AL. A moderate intake of phytosterols from habitual diet affects cholesterol metabolism. *J Physiol Biochem.* **2009a**; 65(4): 397-404.
- Sanclemente T**, Marques-Lopes I, Puzo J and Garcia-Otin AL. Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels. *J Physiol Biochem.* **2009b**; 65(1): 87-98.
- Santosa S**, Demonty I, Lichtenstein AH and Jones PJ. Cholesterol metabolism and body composition in women: the effects of moderate weight loss. *Int J Obes (Lond).* **2007a**; 31(6): 933-41.
- Santosa S**, Demonty I, Lichtenstein AH, Ordovas JM and Jones PJ. Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 are associated with changes in cholesterol metabolism during weight loss. *J Lipid Res.* **2007b**; 48(12): 2607-13.
- Santosa S**, Varady KA, AbuMweis S and Jones PJ. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci.* **2007c**; 80(6): 505-14.
- Sarkkinen ES**, Uusitupa MI, Gylling H and Miettinen TA. Fat-modified diets influence serum concentrations of cholesterol precursors and plant sterols in hypercholesterolemic subjects. *Metabolism.* **1998**; 47(6): 744-50.
- Sato R**, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T and Maeda M. Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem.* **1999**; 274(35): 24714-20.
- Schwarz M**, Russell DW, Dietschy JM and Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res.* **2001**; 42(10): 1594-603.

- Sehayek E**, Nath C, Heinemann T, McGee M, Seidman CE, Samuel P and Breslow JL. U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res.* **1998a**; 39(12): 2415-22.
- Sehayek E**, Ono JG, Shefer S, Nguyen LB, Wang N, Batta AK, Salen G, Smith JD, Tall AR and Breslow JL. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998b**; 95(17): 10194-9.
- Sharp D**, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME and Rader DJ. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature.* **1993**; 365(6441): 65-9.
- Shen H**, Howles P and Tso P. From interaction of lipidic vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**; 50 Suppl 1: S103-25.
- Siddiqi SA**, Gorelick FS, Mahan JT and Mansbach CM, 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci.* **2003**; 116(Pt 2): 415-27.
- Simon JS**, Karnoub MC, Devlin DJ, Arreaza MG, Qiu P, Monks SA, Severino ME, Deutsch P, Palmisano J, Sachs AB, Bayne ML, Plump AS and Schadt EE. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics.* **2005**; 86(6): 648-56.
- Simonen P**, Gylling H, Howard AN and Miettinen TA. Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* **2000**; 72(1): 82-8.
- Simonen PP**, Gylling H and Miettinen TA. Body weight modulates cholesterol metabolism in non-insulin dependent type 2 diabetics. *Obes Res.* **2002**; 10(5): 328-35.
- Simonen PP**, Gylling H and Miettinen TA. The distribution of squalene and non-cholesterol sterols in lipoproteins in type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* **2007**; 194(1): 222-9.
- Singh K**, Batuman OA, Akman HO, Kedees MH, Vakil V and Hussain MM. Differential, tissue-specific, transcriptional regulation of apolipoprotein B secretion by transforming growth factor beta. *J Biol Chem.* **2002**; 277(42): 39515-24.
- Slight I**, Bendayan M, Malo C, Delvin E, Lambert M and Levy E. Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane. *Exp Cell Res.* **2004**; 300(1): 11-22.
- Small DM**. Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. *Fed Proc.* **1970**; 29(4): 1320-6.

- Small DM** and Shipley GG. Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science*. **1974**; 185(147): 222-9.
- Sofi F**, Cesari F, Abbate R, Gensini GF and Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*. **2008**; 337: a1344.
- Staprans I**, Pan XM, Rapp JH and Feingold KR. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res*. **2005**; 49(11): 1075-82.
- Steinberg D** and Gotto AM, Jr. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside. *JAMA*. **1999**; 282(21): 2043-50.
- Sudhop T**, Gottwald BM and von Bergmann K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism*. **2002a**; 51(12): 1519-21.
- Sudhop T**, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Luers C, Berthold HK and von Bergmann K. Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut*. **2002b**; 51(6): 860-3.

T

- Tabas I**. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. **2002**; 110(7): 905-11.
- Talati R**, Sobieraj DM, Makanji SS, Phung OJ and Coleman CI. The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc*. **2010**; 110(5): 719-26.
- Tanaka T**, Delgado-Lista J, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Marin C, Perez-Martinez P, Gomez P and Ordovas JM. Scavenger receptor class B type I (SCARB1) c.1119C>T polymorphism affects postprandial triglyceride metabolism in men. *J Nutr*. **2007**; 137(3): 578-82.
- Tang W**, Ma Y, Jia L, Ioannou YA, Davies JP and Yu L. Genetic inactivation of NPC1L1 protects against sitosterolemia in mice lacking ABCG5/ABCG8. *J Lipid Res*. **2009**; 50(2): 293-300.

- Temel RE**, Gebre AK, Parks JS and Rudel LL. Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem.* **2003**; 278(48): 47594-601.
- Temel RE**, Hou L, Rudel LL and Shelness GS. ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* **2007**; 48(7): 1618-27.
- Temel RE**, Lee RG, Kelley KL, Davis MA, Shah R, Sawyer JK, Wilson MD and Rudel LL. Intestinal cholesterol absorption is substantially reduced in mice deficient in both ABCA1 and ACAT2. *J Lipid Res.* **2005**; 46(11): 2423-31.
- Thomson AB**. Influence of site and unstirred layers on the rate of uptake of cholesterol and fatty acids into rabbit intestine. *J Lipid Res.* **1980**; 21(8): 1097-107.
- Thuahnai ST**, Lund-Katz S, Williams DL and Phillips MC. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J Biol Chem.* **2001**; 276(47): 43801-8.
- Thurnhofer H** and Hauser H. Uptake of cholesterol by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry.* **1990**; 29(8): 2142-8.
- Tilvis RS** and Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* **1986**; 43(1): 92-7.
- Tomoyori H**, Kawata Y, Higuchi T, Ichi I, Sato H, Sato M, Ikeda I and Imaizumi K. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* **2004**; 134(7): 1690-6.
- Tsubakio-Yamamoto K**, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Ohama T and Yamashita S. Current Therapy for Patients with Sitosterolemia -Effect of Ezetimibe on Plant Sterol Metabolism. *J Atheroscler Thromb.* **2010**; 17(9):891-900.

V

- van Bennekum A**, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC and Hauser H. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry.* **2005a**; 44(11): 4517-25.

- van Bennekum AM**, Nguyen DV, Schulthess G, Hauser H and Phillips MC. Mechanisms of cholesterol-lowering effects of dietary insoluble fibres: relationships with intestinal and hepatic cholesterol parameters. *Br J Nutr.* **2005b**; 94(3): 331-7.
- van der Veen JN**, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S, Staels B, Groot PH, Groen AK and Kuipers F. Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res.* **2005**; 46(3): 526-34.
- van der Veen JN**, van Dijk TH, Vrans CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJ, Groen AK and Kuipers F. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem.* **2009**; 284(29): 19211-9.
- Van Eck M**, Pennings M, Hoekstra M, Out R and Van Berkel TJ. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **2005**; 16(3): 307-15.
- Vanstone CA** and Jones PJ. Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* **2004**; 79(2): 340-1.
- Vincent-Baudry S**, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolier P, Amiot-Carlin MJ, Vague P and Lairon D. The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr.* **2005**; 82(5): 964-71.
- Vincent S**, Gerber M, Bernard MC, Defoort C, Loundou A, Portugal H, Planells R, Juhan-Vague I, Charpiot P, Grolier P, Amiot-Carlin MJ, Vague P and Lairon D. The Medi-RIVAGE study (Mediterranean Diet, Cardiovascular Risks and Gene Polymorphisms): rationale, recruitment, design, dietary intervention and baseline characteristics of participants. *Public Health Nutr.* **2004**; 7(4): 531-42.
- Von Bergmann K**, Lutjohann D, Lindenthal B and Steinmetz A. Efficiency of intestinal cholesterol absorption in humans is not related to apoE phenotype. *J Lipid Res.* **2003**; 44(1): 193-7.
- von Bergmann K**, Sudhop T and Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol.* **2005**; 96(1A): 10D-14D.
- Voshol PJ**, Schwarz M, Rigotti A, Krieger M, Groen AK and Kuipers F. Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *Biochem J.* **2001**; 356(Pt 2): 317-25.

W

- Wang DQ.** Aging per se is an independent risk factor for cholesterol gallstone formation in gallstone susceptible mice. *J Lipid Res.* **2002**; 43(11): 1950-9.
- Wang DQ.** Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol.* **2007**; 69: 221-48.
- Wang DQ,** Schmitz F, Kopin AS and Carey MC. Targeted disruption of the murine cholecystokinin-1 receptor promotes intestinal cholesterol absorption and susceptibility to cholesterol cholelithiasis. *J Clin Invest.* **2004a**; 114(4): 521-8.
- Wang HH,** Afdhal NH and Wang DQ. Estrogen receptor alpha, but not beta, plays a major role in 17beta-estradiol-induced murine cholesterol gallstones. *Gastroenterology.* **2004b**; 127(1): 239-49.
- Wang Y,** Vanstone CA, Parsons WD and Jones PJ. Validation of a single-isotope-labeled cholesterol tracer approach for measuring human cholesterol absorption. *Lipids.* **2004c**; 39(1): 87-91.
- Weihrauch JL** and Gardner JM. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc.* **1978**; 73(1): 39-47.
- Weinberg RB,** Cook VR, DeLozier JA and Shelness GS. Dynamic interfacial properties of human apolipoproteins A-IV and B-17 at the air/water and oil/water interface. *J Lipid Res.* **2000**; 41(9): 1419-27.
- Weingartner O,** Lutjohann D, Bohm M and Laufs U. Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* **2010**; 210(2): 362-5.
- Weng W,** Li L, van Bennekum AM, Potter SH, Harrison EH, Blaner WS, Breslow JL and Fisher EA. Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochemistry.* **1999**; 38(13): 4143-9.
- Westergaard H** and Dietschy JM. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *J Clin Invest.* **1976**; 58(1): 97-108.
- Wetterau JR,** Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ and Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science.* **1992**; 258(5084): 999-1001.

- Wetterau JR**, Combs KA, Spinner SN and Joiner BJ. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem.* **1990**; 265(17): 9800-7.
- Willett WC**, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E and Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* **1995**; 61(6 Suppl): 1402S-1406S.
- Wilson MD** and Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res.* **1994**; 35(6): 943-55.
- Wu X**, Zhou M, Huang LS, Wetterau J and Ginsberg HN. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. *J Biol Chem.* **1996**; 271(17): 10277-81.

Y

- Yao L**, Heubi JE, Buckley DD, Fierra H, Setchell KD, Granholm NA, Tso P, Hui DY and Woollett LA. Separation of micelles and vesicles within luminal aspirates from healthy humans: solubilization of cholesterol after a meal. *J Lipid Res.* **2002**; 43(4): 654-60.
- Yu L**. The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein. *Curr Opin Lipidol.* **2008**; 19(3): 263-9.
- Yu L**, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, Michaely P, Liu P, Willingham MC and Rudel LL. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem.* **2006**; 281(10): 6616-24.
- Yu L**, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC and Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002a**; 99(25): 16237-42.
- Yu L**, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC and Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* **2002b**; 110(5): 671-80.
- Yu L**, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC and Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem.* **2003**; 278(18): 15565-70.

Z

- Zamel R**, Khan R, Pollex RL and Hegele RA. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J Rare Dis.* **2008**; 3: 19.
- Zeissig S**, Dougan SK, Barral DC, Junker Y, Chen Z, Kaser A, Ho M, Mandel H, McIntyre A, Kennedy SM, Painter GF, Veerapen N, Besra GS, Cerundolo V, Yue S, Beladi S, Behar SM, Chen X, Gumperz JE, Breckpot K, Raper A, Baer A, Exley MA, Hegele RA, Cuchel M, Rader DJ, Davidson NO and Blumberg RS. Primary deficiency of microsomal triglyceride transfer protein in human abetalipoproteinemia is associated with loss of CD1 function. *J Clin Invest.* **2010**; 120(8): 2889-99.
- Zhao C** and Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol.* **2010**; 204(3): 233-40.
- Zilversmit DB**. A single blood sample dual isotope method for the measurement of cholesterol absorption in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1972**; 140(3): 862-5.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire de recherche INRA, UMR1260 et INSERM ERL1025 “Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques”, Facultés de Médecine et de Pharmacie IPHM-IFR 125, 27 Boulevard Jean Moulin, Marseille, 13385 Cedex 05, France.