UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Claire Blanchard Louis

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

grade de Docteur de l'Université de Nantes

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : BIOLOGIE SANTÉ (ED 502)

Discipline : Biologie

Spécialité : *Physiologie, Biologie cellulaire et moléculaire*

Unité de recherche : *INSERM UMR 1087*

CNRS UMR 6291

Soutenue le *16 décembre 2016*

Thèse N° :

Effets de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol

JURY

President du jury	**Philippe BESNARD**, PU, Equipe NUTox, UMR Lipides/Nutrition/Cancer U866 INSERM - AgrosupDijon
Rapporteurs :	**Philippe BESNARD**, PU, Equipe NUTox, UMR Lipides/Nutrition/Cancer U866 INSERM - AgrosupDijon
	Fabrizio ANDREELLI, PUPH, Institut E3M, Hôpitaux Universitaires Pitié Salpétrière-Charles Foix
Examinateurs :	**François PATTOU,** PUPH, Chirurgie Générale et Endocrinienne, Lille
	Eric MIRALLIE, PUPH, Service de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU Nantes
Directeur de Thèse :	**Bertrand CARIOU**, PUPH, Service d'Endocrinologie et Nutrition, Nantes
Co-directeur de Thèse :	**Cédric LE MAY**, Chargé de Recherche, CNRS, Nantes

Remerciements

A mes 3 hommes, qui illuminent ma vie

“Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.” (Marcel Proust)

Aux membres du jury

A Monsieur le Président : Professeur P Besnard

C'est un véritable honneur pour moi que vous présidiez ma thèse. Je suis très heureuse de travailler avec vous sur un projet commun portant sur la chirurgie bariatrique et les bourgeons du goût. Vos connaissances, votre expérience et vos publications forgent mon admiration. Permettez-moi de vous exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur F Andreelli :

Merci d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de ma thèse et d'avoir répondu rapidement à mes diverses sollicitations. Vos connaissances, vos publications et votre carrière forgent mon admiration. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur F Pattou :

Monsieur je suis très honorée que vous ayez accepté d'être dans mon jury de thèse et de juger mon travail. Les 6 mois en interchu dans votre service m'ont énormement apporté professionnellement tant dans la pratique de mon métier de chirurgien que dans la rigueur et la construction scientifique. Je suis très reconnaissante de l'enseignement que vous m'avez accordé. Votre parcours est un modèle à suivre. Permettez-moi, Monsieur, de vous exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Profeseur B Cariou :

Lors de notre premier rendez-vous afin de discuter de mon sujet de thèse, vous m'avez proposé avec Cédric ce sujet innovant et passionant sans pour autant me connaitre. Merci de m'avoir accordé votre confiance. J'apprends tous les jours à vos côtés et vous me permettez de progresser de jours en jours, dans ma construction scientifique. J'ai pour vous une profonde estime et admiration professionnelle. J'espère que bientôt nous fêterons les publications autour d'une bonne bière.

A Monsieur le Docteur C Le May :

Merci de m'avoir accepté dans ton équipe TICE, sans avoir auparavant travaillé avec moi. Malgré quelques désaccords, notamment sur le fait qu'une vie sans Apple n'est pas possible et mon sens de l'esthétisme dans mes présentations, j'apprécie beaucoup travailler à tes cotés et continuer à monter des projets communs. Merci de me faire confiance et me permettre au sein de l'unité de garder une grande liberté. Je t'en suis très reconnaissante. J'espère que notre travail aboutira à de nouvelles publications.

A Monsieur le Professeur E. Mirallié

Vous m'avez permis de réaliser ce travail, de me libérer du temps précieux au sein de votre service et je vous en remercie. Merci de me pousser et de m'encourager, dans ce chemin plein d'embuches qu'est le parcours universitaire. C'est pour moi un réel honneur de travailler à vos côtés. J'ai pour vous une profonde estime. Je suis reconnaissante de tout ce que vous m'apportez au quotidien dans la pratique de mon futur métier de Chirurgien, même si j'avoue râler parfois.

A mes collègues et maîtres en chirurgie

A Monsieur le Professeur P.A Lehur

Merci pour votre aide dans mon parcours universitaire. Vos connaissances, votre expérience et votre sens de l'organisation forgent mon admiration. Permettez-moi de vous exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur G Meurette

Ton expérience récente dans le parcours universitaire, ton ouverture d'esprit et tes conseils avisés me sont plus qu'utiles. Même si je sais que la chirurgie bariatrique est pour toi une égnime dans la durée, j'espère que cette thèse permettra d'apporter quelques réponses à ton questionnement.

A mes collègues : Dr Regenet, Dr Metairie, Dr Caillard et Dr Podevin

Merci pour votre aide et votre formation au quotidien dans notre métier de chirurgien. Merci de m'avoir libéré du temps afin que je puisse mener à bien ce projet. La recherche est indispensable dans notre si beau métier, merci de l'avoir compris.

A mes cochefs de clinique : Christophe, Antoine, Anne-Sophie, Myriam, Emilie R, Ludwig, Guénolé et Emilie D.

Un grand merci pour avoir compris sans jamais me l'avoir reprocher de demander du temps pour la réalisation de ce travail. Merci à Christophe pour son aide précieuse au début de mon clinicat et ces blagues plus que douteuses (mes fonds d'ecran te remercient). Merci à Myriam pour ton amitié si précieuse, ton aide dans le développement de la chirurgie bariatrique et ton soutien dans les moments de doute. Merci à toi Emilie D. Partagez la même curiosité, envie de recherche en chirurgie dans des domaines différents est une grande stimulation. Bon voyage aux Etats-Unis.

A Adeline ma secrétaire

Merci d'être là pour faciliter mon quotidien et mon organisation de plus en plus bancale. Ton sourire et ta bonne humeur sont un réel plaisir. En espérant travailler ensemble encore de nombreuses années.

Un grand merci pour la réalisation de ce travail

Merci au Pr Hervé le Marec et à Richard Redon

Merci de m'avoir permis de pouvoir réaliser ce travail de thèse au sein de l'institut du Thorax. Cet institut est une grande unité de recherche fondamentale et translationnelle au sein du CHU de Nantes, reconnue nationalement et internationalement. Je réalise la chance d'en faire partie.

A toute l'équipe de l'U1087 équipe 5 et plus particulièrement :

A Audrey

Quelle belle rencontre. J'apprécie beaucoup de travailler à tes côtés, et ce travail est aussi le tien. Ta titularisation est plus que méritée. Profite de ce bonheur d'être maman pour la 2ème fois. A tout bientôt pour de nouveaux projets. J'espère que par la suite, nous aurons un peu plus de temps à partager que le travail.

A Francois

Ce travail est aussi le tien. Merci pour ton investissement dans ce projet. D'avoir toujours répondu présent à mes questionnements, même parfois très tard et le week-end, je m'en excuse. Je te souhaite une très belle thèse et un bel avenir professionnel, amplement mérité. Je suis très heureuse d'avoir partagé ces 3 années à tes côtés. Ta détermination et ton sens critique sont tout à ton honneur.

A Laurence

Ta capacité de travail et ta rigueur sont à ton honneur. Cette thèse a pu être terminée à temps en grande partie grâce à toi. Un grand merci. Continue avec la même énergie et n'oublie pas tes projets personnels…Je te souhaite un très bel avenir professionnel.

A Fred

Tu as permis grâce à ta pugnacité d'améliorer le modèle bypass et de permettre une augmentation très significative de la survie des animaux. Un grand merci. Garde cette énergie et ce goût pour la chirurgie bariatrique. Je te souhaite un très bel avenir porfessionnel avec les choix qui seront les tiens, ainsi que personnel.

A Damien

On se connait peu, mais j'apprécie beaucoup de travailler à tes côtés dans la bonne humeur. Merci pour l'analyse finale, qui a permis de finir à temps le papier. Je te souhaite une très belle thèse de science dans cette équipe plus que dynamique.

A Matthieu Pichelin

Merci pour ton aide si précieuse dans le montage de dossiers de recherche clinique. J'ai appris en un temps record à tes côtés et cela m'a permis d'aboutir à de beaux projets. Sur le plan plus personnel, j'apprécie partager avec toi ce goût pour la Bretagne et la côte Sud du Finistère, où un micro climat y règne.

A Lucie

Merci pour ton aide dans l'analyse des datas et ta bonne humeur durant ces 3 années.

Et l'ensemble de l'équipe : Xavier, Clara, Lucille, Jocelyne, Karim, Giliane, Amandine et Benoîte.

Merci de faire de cette équipe, son dynamisme et sa pluralité.

Sans oublier l'ensemble des animaliers, de Marie Liabeuf et Stéphanie Le Marchand, pour leur aide si précieuse dans le bon déroulement de l'ensemble des expériences animales.

Marie merci pour ton aide précieuse dans ce travail et ton amitié.

Merci à **Agnès Hivonnait et Angès Carcouet** pour leurs aides et leurs conseils avisés au sein de l'animalerie. Merci de nous avoir permis de nous installer dans votre pièce où vous pratiquez vos manips.

Je tiens à remercier **Michel Neunlist et Julien Chevalier** pour leur aide précieuse pour la réalisation, leurs savoirs et l'écriture du papier portant sur les fonctions digestives et la sleeve gastrectomie. Merci Michel de continuer à me faire confiance.

A mes amis

Merci d'être là et ne changez rien. Quel plaisir de boire l'apéro, partir en week-end, en vacances et de voir nos enfants grandir ensemble. J'espère qu'à l'avenir, j'aurais plus de moment pour partager du temps avec vous. La vie est trop courte, profitons-en.

A **Carole et Thomas** pour notre amitié si précieuse à mes yeux, à quand le mariage ?

A **Claire et Xavier** pour votre présence dans notre vie et votre amitié si précieuse.

A **Delphine et Raphael**, merci pour votre compréhension ces derniers temps. Merci pour votre générosité et cette rage de vivre.

A **Emilie**, je suis très heureuse de partager avec toi cet amour de la chirurgie et de t'avoir comme amie. Garde ce dynamisme et cette envie…

A **Maryam et Greg**, malgré les distances, être à vos côtés et toujours un réel plaisir.

A **Eliette et Xavier**. Nous sommes très heureux de partager des beaux moments avec vous. Hâte de décrouvir votre deuxième merveille.

Toute **la dream team de Nancy**, que de bons souvenirs et de franches rigolades, quel bonheur de se retrouver chaque année avec de nouveaux bébés.

A ma famille

A mes beaux-parents et Elise et Patrick

Merci de m'avoir accepté dans votre famille si accueillante. Ca y est un 3ème petit Louis (surprise) va embellir cette nouvelle année 2017. Pour rassurer ceux qui lisent, ce n'est pas moi !!!! Merci pour votre présence, votre aide et tout ce que vous apportez aux enfants.

A ma grand-mère

Merci d'avoir été là pendant toute mon enfance et après. Tu es une femme exceptionnelle. J'aurai une pensée émue pour pépère en ce jour important.

A ma maman

Je sais que parfois mes choix professionnels te semblent déraisonnable pour moi et pour ma famille. J'espère qu'en écoutant et en lisant ma thèse tu comprendras ce besoin intérieur de comprendre, de me dépasser et de me remettre toujours en question. Merci d'être là et d'avoir accepté mes choix.

A mes sœurs, Sophie et Julie, mais aussi mes beaux frères sans oublier ma petite Capucine

Merci d'être là. Nous avons la chance d'être une famille unie, malgré les engeulades ☺. Quel bonheur de vous avoir à mes côtés. Hâte d'être marraine une nouvelle fois.

A mon père

Tu n'es plus là pour assister à ma soutenance, mais je sais que tu veilles sur moi et ma famille. Merci de me donner cette force intérieure qui me fait déplacer les montagnes.

A Matthieu

Merci d'être là, de me soutenir dans mes choix et d'être le pilier de notre famille. Tu es un mari et un père merveilleux. Merci de m'avoir permis de mener à bien ce travail, et d'avoir trouvé les mots pour me donner la force de terminer ce travail.

Gaston, Félix

Ces 3 années n'ont pas été toujours facile pour vous, entre les gardes, les astreintes souris et ce travail personnel. Votre énergie, ton esplégerie (Félix) et ta curiosité (Gaston), nous épuisent parfois votre père et moi mais quel bonheur de vous avoir. Gardez cette belle complicité, les bêtises en moins… Nous sommes très fiers de vous et nous vous aimons plus que tout nos 2 petits « presque » anges.

Sommaire

Remerciements 2
Sommaire 13
Résumé 16
Abstract 17
Avant-propos 18
Liste des abréviations 19
Listes des figures 21
Listes des tableaux 21
1. Chapitre 1 : L'obésité 22
1.1. Historique : 22
1.2. Définition de l'obésité 22
1.3. Prévalence de l'obésité en France 23
1.4. Les causes de l'obésité 24
1.5. Impact de l'obésité et ses conséquences notamment métabolique 29
1.5.1. Impact de l'obésité sur la mortalité 30
1.5.2. Impact de l'obésité sur le cancer 31
1.5.3. Impact de l'obésité sur le diabète 32
1.5.4. Impact de l'obésité sur le syndrome d'apnée hypopnée obstructif du sommeil et asthme 34
1.4.5. Impact de l'obésité sur le risque cardio-vasculaire etl'hypertension artérielle 35
1.5.6. Obésité et syndrome métabolique 35
1.5.7. Impact de l'obésité sur la qualité de vie et les troubles psychiatriques 37
1.5.8. Impact de l'obésité sur la dyslipidémie 38
1.5.9. Impact de l'obésité sur les pathologies ostéo-articulaires 38
1.5.10. Impact de l'obésité sur les pathologies digestives 39
1.6. Recommandations de l'HAS pour la prise en charge de l'obésité 40
1.6.1. Prise en charge médicale 40
1.6.2. La prise en charge chirurgicale 41
2. Chapitre 2 la chirurgie Bariatrique: 45
2.1. Histoire de la chirurgie bariatrique et historique des interventions 45
2.2. Les différentes techniques chirurgicales actuelles : 49
2.2.1. L'anneau gastrique 49
2.2.2. La sleeve gastrectomie 50
2.2.3. Le Roux-en-Y Gastric Bypass 51
2.2.4. Le mini Bypass (bypass en oméga) 52
2.2.5. La diversion bilio-pancréatique (switch duodénal) 53
2.2.6. Les modèles animaux de chirurgie bariatrique 54
2.3. Conséquences de la chirurgie bariatrique 56
2.3.1. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur le diabète 57

2.3.2. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur les dyslipidémies 60
2.3.3. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur l'hypertension, le risque cardiovasculaire et la mortalité 63
2.3.4. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur les pathologies digestives 65
2.3.5. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur les autres pathologies 66
3. Chapitre 3 : Les fonctions digestives 69
3.1. L'estomac 69
3.1.1. Anatomie 69
3.1.2. Histologie 69
3.2. L'intestin grêle 70
3.2.1. Anatomie 70
3.2.2. Histologie 71
3.2.3. Rôle des peptides gastrointestinaux 72
3.3. La motricité digestive 74
3.4. La barrière épithéliale intestinale 76
3.4.1. Description 76
3.4.2. Perméabilité paracellulaire et transcellulaire 79
3.4.3. Fonctions extrinsèques 84
3.5. Effets du régime hyperlipidique sur les fonctions gastro-intestinales 85
3.5.1. Effets du régime hyperlipidique sur la motricité gastro-intestinale 85
3.5.2. Effets du régime hyperlipidique sur la perméabilité et la BEI 86
3.5.3. Perméabilité et microbiote 87
3.5.4. Effets du régime hyperlipidique sur l'inflammation 88
3.6. Effets de la chirurgie bariatrique sur les fonctions gastro-intestinales 89
4. Chapitre 4 : Le métabolisme du cholestérol 94
4.1. Généralités sur le cholestérol et fonctions du cholestérol 95
4.1.1. Généralités et origine du cholestérol : endogène et exogène 95
4.2. Métabolisme du cholestérol 97
4.3. Les lipoprotéines et les apolipoprotéines 100
4.4. La voie exogène entéro-hépatique 102
4.4.1. Absorption intestinale 102
4.4.2. Export entérocytaire du cholestérol absorbé 106
4.5. La voie endogène 109
4.5.1. Synthèse endogène hépatique et rôle des facteurs de transcription SREBP2 109
4.5.2. L'apport du cholestérol aux tissus 110
4.5.3. Captation du cholestérol 110
4.5.4. le LDLR 112
4.5.5. PCSK9 113
4.6. La voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT) 115
4.7. Les voies d'élimination du cholestérol 117
4.7.1. L'élimination biliaire 117
4.7.2. L'excrétion transintestinale du cholestérol ou TICE 119

5. Chapitre 5. Rôle des acides biliaires dans le métabolisme lipidique 124
5.1. Les acides biliaires : de nouveaux régulateurs métaboliques 124
5.2. Les acides biliaires et le métabolisme lipidique 126
5.3. Farnesoid X receptor (FXR) et TGR 5 127
5.4. Les acides biliaires et la chirurgie bariatrique 129
Objectif de mon travail 131
Les articles originaux 133
Article 1 134
Article 2 : 151
Article 3 : 177
Review 1 : L'excrétion trans-intestinale du cholestérol 211
Conclusion et Perspectives 232
Bibliographie 234
Publications 271
Communications orales 272
Communications affichées 272
Prix 272

Résumé

L'obésité représente un problème de santé publique majeur, avec une prévalence en augmentation. Celle-ci peut s'accompagner de complications métaboliques telles que le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, et les dyslipidémies. La chirurgie bariatrique constitue l'alternative thérapeutique de choix chez ces patients. La cholestérolémie est clairement améliorée chez les patients opérés, mais différemment en fonction des techniques chirurgicales pratiquées, suggérant que les mécanismes cellulaires et moléculaires impliquées varient selon les méthodes chirurgicales. Notre travail réalisé chez un modèle murin, a mis en évidence une baisse de la cholestérolémie après un bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y (en anglais Roux-en-Y gastric bypass ou RYGBP) plus importante qu'après une gastrectomie longitudinale (ou Sleeve gastrectomie). Le RYGBP induit une augmentation de l'excrétion fécale du cholestérol via une stimulation de l'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE) et une réduction de la capacité intestinale à absorber le cholestérol. Dans ce contexte, et en élargissant vers une prise en charge innovante de l'hypercholestérolémie, le TICE semble être une cible thérapeutique intéressante. Parallèlement à ce travail, nous avons étudié en collaboration avec l'INSERM U913 (Dr Neunlist), l'effet précoce de la Sleeve gastrectomie sur la barrière intestinale. La Sleeve induit des modifications de la perméabilité et de l'expression des protéines des jonctions serrées. Ces changements accroissent la translocation du LPS dans le plasma, favorisant ainsi un état pro-inflammatoire adipocytaire. L'effet tardif de la Sleeve sur la perméabilité intestinale reste à être déterminé.

Mots clés

Obésité, Cholestérolémie, Chirurgie bariatrique, TICE, Absorption intestinale de cholestérol, perméabilité intestinale para et trans cellulaire

Abstract

Obesity is a major public health issue, with increasing prevalence. Metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension and dyslipidemia are frequently associated with morbid obesity. Bariatric surgery represents the alternative therapeutic of choice for these patients. Clinical studies show that plasma cholesterol is clearly improved after surgery. Interestingly the magnitude of reduction depends on the surgical techniques used suggesting that cellular and molecular mechanisms involved are different.

Using mouse models, we demonstrated that Roux en Y Gastric Bypass (RYGBP) strongly decreased plasma cholesterol compared to sleeve gastrectomy. RYGBP increases fecal cholesterol excretion via the stimulation of trans intestinal cholesterol excretion (TICE) and a reduction of intestinal cholesterol absorption. In this context, and expanding in the management of hypercholesterolemia, TICE seems to be an interesting therapeutic target. In parallel with this work, we assessed, in collaboration with members of INSERM U913 (Dr Neunlist), the short-term effect of sleeve gastrectomy on intestinal barrier. We show that sleeve gastrectomy induces significant modifications of intestinal para and transcellular permeability by altering the expression of proteins involved in tight junctions. These changes favor plasma LPS translocation promoting a low grade pro-inflammatory state in adipose tissue. These effects of sleeve gastrectomy on intestinal permeability remain to be assessed after a longer post-surgical period.

Key Words

Obesity, Cholesterolemia, Bariatric surgery, TICE, Intestinal cholesterol absorption, Para and transcellular permeability

Avant-propos

Dans cette première partie, nous chercherons à définir et à expliquer les conséquences métaboliques de l'obésité. Nous détaillerons ensuite les différentes procédures bariatriques et leurs efficacités respectives en termes de perte de poids et de résolution des co-morbidités, avec le concept actuel de chirurgie métabolique. Puis nous nous focaliserons sur la thématique de mon travail de thèse avec l'étude des grandes fonctions digestives, le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires, en étudiant l'effet de la chirurgie bariatrique sur ceux-ci. Enfin, nous présenterons nos résultats tant en termes de conséquences métabolique sur le métabolisme du cholestérol après chirurgie bariatrique mais aussi sur la modification de la perméabilité para-et trans-cellulaire. Tous ces résultats ont été obtenus chez la souris. En parallèle de ce travail fondamental, nous avons mis en évidence de manière indirecte par spectrométrie de masse, le TICE (Excrétion Trans intestinale de Cholesterol) chez l'homme, ces résultats ne sont pas présentés dans le manuscrit.

Liste des abréviations

AB : Acide Biliaire
ABC : Adenosine triphosphate Binding Cassette
ABCA1 : ATP-binding cassette, sous famille A, isoforme 1
ABCB4 : ATP-binding cassette, sous famille B, isoforme 4
ABCG5/8 : ATP-binding cassette, sous famille G, isoforme 5/8
ACAT2 : Acylcoenzyme 17 cholesteryl acyltransferase 2
AFERO : Association Française d'études et de recherche sur l'obésité
AG : Anneau Gastrique
AGL : Acides Gras Libres
AGMI : Acides Gras Mono-insaturés
AGPI : Acides Gras Poly-insaturés
AGS : Acides Gras saturés
Apo : apolipoprotéines
AVC : Accident vasculaire cérébral
BD : Bilio-diversion
BEI : Barrière épithéliale intestinale
BSEP : Bile Salt Export Pump
CD36 : Cluster of Differentiation 36
CEI : Cellule Epithéliale Intestinale
CETP : Cholesteryl ester transfer protein
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CV : Cardio vasculaire
Cyp7A1 : Cytochrome P450 7A1
DB : Dérivation Bilio-Pancréatique
DT2 : Diabète type 2
FAS : fatty acid synthase
FID : Fédération Internationale du Diabète
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
FXR : Farnesoid X Receptor
GLP1 : Glucagon Like Peptide 1
GLUT : Glucose Transporteur
GVC : Gastroplastie Verticale Calibrée
HAS : Haute Autorité de Santé
HDL : High Density Lipoprotein
HDL-c : High Density Lipoprotein cholesterol
HFD : High Fat Diet
HMG-CoA réductase : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase
HMG-CoA synthase: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
HRP : Horseadish peroxidase
HTA : Hypertension artérielle
IARC : International agency for research on cancer
$IC_{99\%}$: Intervalle de confiance de 99%
$IC_{95\%}$: Intervalle de confiane de 95%
IDF : International Diabetes Federation
IDL : Intermediary Density Lipoprotein
IMC : Indice de Masse Corporelle
INCa : Institut National de Cancer

Il6 : Interleukine 6
JAM : Junction Adhesion Molecule
LCAT : Lecithine Cholesterol Acyl Transferase
LDL : Liporotéine de faible densité (Low Density Lipoprotein)
LDL-c : Low Density Lipoprotein cholesterol
LDLR : Recepteur aux LDL
LE : Lipase endothéliale
LH : Lipase hépatique
LPL : Lipoprotéine lipase
HTA : Hypertension Artérielle
MCA : Muricholic acid
NASH : Non-Alcoholic Steato-Hepatitis
NCEP : National Centers for Environmental Prediction
NPC1L1 : Niemann-Pick C1 Like1
NTCP : Na^+-taurocholate cotransporting polypeptide
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : odds ratio
PCSK9 : Proprotéine Convertase Subtilisine/Kexine de type 9
PEP : Perte Excès de Poids
PMSI : Programme Médicalisation des Systèmes d'Information
PNNS : Programme national nutrition santé
PPARδ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta
RCT : Retour inverse du cholestérol (reverse cholesterol transport)
RE : Reticulum Endoplasmique
RYGBP : Roux-en-Y Gastric Bypass
RXR : Retinoid X Receptor
SAHOS : Syndrome d'Apnéee-Hypopnée Obstructif du Sommeil
SG : Sleeve Gastrectomie
SHP: Small Heterodimer Partner
SNE : Système Nerveux Entérique
SR-B1 : Scavenger Receptor class B1
SREBP1c : Sterol-responsive element-binding protein 1c
SREBP2 : Sterol-responsive element-binding protein 2
TG : Triglycérides
TGR5 (ou GPBAR1) G protein-coupled bile acid receptor 1
TICE : Excrétion Trans-Intestinale de Cholestérol
TNFα : Tumor Necrosis Factor α
TSH : Thyréostimuline
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
WT : Wild type
ZO : Zonula Occludens

Listes des figures

Figure 1 : Principales comorbidités associées à l'obésité
Figure 2 : Technique de l'anneau gastrique
Figure 3 : Technique de la sleeve gastrectomie
Figure 4 : Technique du Roux-en-Y Gastric Bypass
Figure 5 : Technique du mini bypass (bypass en oméga)
Figure 6 : Technique de la diversion bilio-pancréatique (switch duodénal)
Figure 7 : Impact de la chirurgie bariatrique sur la dyslipdémie (Buchwald 2004)
Figure 8 : Anatomie estomac
Figure 9 : Histologie de l'intestin grêle
Figure 10 : Rôle schématique des peptides gastro-intestinaux
Figure 11 : Concepts fondamentaux de la restitution épithéliale (Taupin and Podolsky 2003)
Figure 12 : Organisation du cytosquelettedes cellules épithéliales intestinales (Tsukita 2001)
Figure 13 : Schéma simplifié de l'organisation moléculaire des jonctions serrées (Niessen 2007)
Figure 14 : Mécanismes par lesquels les nutriments traversent la barrière
Figure 15 : Mécanisme de pinocytose
Figure 16 : Mécanisme endocytose
Figure 17 : Molécule cholestérol
Figure 18 : Synthèse du cholestérol endogène
Figure 19 : Voie exogène et endogène du métabolisme des lipides
Figure 20 : Principales voie d'apport (en vert) et d'excrétion (en bleu) du cholestérol dans l'organisme (adapté de Temel 2007 par Fréderic Borel)
Figure 21 : Schéma de la structuration des lipoprotéines
Figure 22 : Schéma absoprtion intestinale du cholesterol (Ravid 2008)
Figure 23 : Export entérocytaire du cholestérol absorbé (Amburad 2012)
Figure 24 : Captation du LDL par le LDLr
Figure 25 : Schéma de la synthèse et du rôle de PCSK9 hépatique (Costet 2008)
Figure 26 : Réprésentation schématique de la voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT)
Figure 27 : Représentation du TICE et de ses acteurs moléculaires (Le May 2013)

Listes des tableaux

Tableau 1 : Amélioration des comorbidités après chirurgie bariatrique (Rizello 2012)
Tableau 2 : Résolution et amélioration de l'hypertension après chirurgie bariatrique (Schiavon 2016)
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets sur le métabolisme du cholestérol, dans un modèle murin, de la sleeve gastrectomie (SG) et du Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB)

1. Chapitre 1 : L'obésité

1.1. Historique :

Pendant des milliers d'années, le surpoids et l'obésité étaient une condition exceptionnelle, rarement vue et très peu étudiée jusqu'à tout récemment (Jaikanth, 2013). L'obésité était plutôt prisée et considérée comme un signe de richesse et de prospérité : seuls les plus riches avaient la possibilité de devenir obèses (Jaikanth, 2013). Le degré d'obésité caractérisait même le niveau de richesse à défaut des vêtements et des bijoux voyants. Les Grecs ont été les pionniers à réaliser les dangers de l'obésité et son association avec les maladies (Jaikanth, 2013). À ce sujet, Hippocrate a été le premier à identifier le concept de l'équation de la balance énergétique soulignant que pour conserver son corps dans un état stable, tout aliment ingéré devait être compensé par un exercice quelconque pour éliminer l'excès d'énergie (Jaikanth, 2013). Des dizaines de milliers d'années se sont écoulées depuis la survenue de l'obésité. La situation n'est guère plus réjouissante ayant atteint un niveau d'épidémie mondiale (1.4 milliards d'habitants de plus de 20 ans, Organisation Mondiale de Santé, OMS). Dans ce chapitre, un survol de la définition, de la prévalence, des causes et des conséquences liées à l'obésité est présenté.

1.2. Définition de l'obésité

L'OMS définit le surpoids et l'obésité comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». Historiquement, l'obésité était définie à partir du concept de poids idéal et celui-ci a été largement utilisé pour la classification du poids. L'obésité est définie actuellement à partir d'un indice de masse corporelle (IMC)

prenant en compte le poids et la taille (Haute Autorité de Santé (HAS). L'IMC est égal au rapport du poids du sujet en kg sur la taille en mètre au carré : **IMC (kg/m^2) = poids (kg)/taille^2 (m^2).**

Selon l'OMS, le surpoids est défini par IMC compris entre 25,00 et 29,99 kg/m^2 et l'obésité pour un IMC ≥ 30 kg/m2.

Selon cette même classification, **l'obésité est divisée en 3 classes** :

Classe 1 : IMC entre 30 et 34,99 kg/m^2 ; Classe 2 : IMC entre 35,00 et 39,99 kg/m^2 et Classe 3 : IMC ≥ 40 kg/m^2

En plus du poids, le tour de taille est un indice simple pour estimer l'importance des dépôts adipeux abdominaux. Un tour de taille de plus de 80 cm chez la femme et de plus de 94 cm chez l'homme caractérise l'obésité abdominale (l'IDF (International Diabetes Federation)).
Chez le sujet âgé, il n'existe pas de définition consensuelle de l'obésité. Les nutritionnistes préfèrent utiliser le tour de taille au lieu de l'IMC utilisé classiquement, car l'IMC ne prend pas en compte la sarcopénie chez la personne âgée (Batsis, 2015).

1.3. Prévalence de l'obésité en France

L'enquête ObépiRoche réalisée tous les 3 ans, dont les derniers résultats datent de 2012, est un outil indispensable afin de mieux connaître la prévalence et l'incidence de l'obésité en France. Celle-ci met en évidence que 32,3% des Français adultes de 18 ans et plus sont en surpoids (25 ≤ IMC < 30 kg/m2) et 15% présentent une obésité (IMC ≥ 30 kg/m2) (Obépi 2012). Le poids moyen de la population française a augmenté, en moyenne, de 3,6 kg en 15 ans alors que la taille moyenne a augmenté de 0,7 cm. Le tour de taille de la population française lui aussi augmente, passant de 85,2 cm en 1997 à 90,5 cm en 2012, soit +5,3 cm au total en 15 ans. Enfin, la prévalence de l'obésité qui était de 14,5% en 2009, est de 15 % en 2012. Cette

différence non statistiquement significative, correspond à une augmentation relative de 3,4% du nombre de personnes obèses au cours des trois dernières années. Mais grâce à nombreuses campagnes (ex : 5 fruits et légumes par jour, …) et une politique de santé publique importante, cette prévalence semble stagner en comparaison aux années précédentes : +18,8% entre 1999-2000, +17,8% entre 2000-2003, +10,1% entre 2003-2006 et +10,7% entre 2006-2009. Le nombre de personnes obèses en 2012 est estimé à environ 6 922 000, ce qui correspond à 3 356 000 personnes supplémentaires par rapport au chiffre de 1997. L'IMC moyen passe de 24,3 kg/m en 1997 à 25,4 kg/m² en 2012 ($p<0.05$). En 2012, comme depuis 2003, la prévalence de l'obésité est plus élevée chez les femmes (15,7% versus 14.3% chez les hommes ; $p<0.01$). L'augmentation depuis 15 ans est plus nette chez les femmes notamment chez les 18-25 ans. Il persiste un très net gradient social de l'obésité.

1.4. Les causes de l'obésité

D'une manière très schématique, l'obésité découle d'un bilan énergétique positif entre l'apport énergétique et la dépense énergétique (Blomain 2013). Le métabolisme de base représente environ 60% de la dépense énergétique totale et l'effet thermique des aliments, qui correspond à l'énergie dépensée pour la digestion, la transformation et le stockage des aliments, compte pour environ 8 à 10% de la dépense énergétique (Hill 2012). En réalité, l'obésité n'est tout simplement pas le problème unique d'un déséquilibre de la balance énergétique. Elle implique un amalgame de facteurs génétiques, environnementaux (exposition au Biphosphénal A,…) et d'adaptations physiologiques aux variations de poids, principalement dans le développement de l'obésité sévère.

Le rôle des facteurs génétiques dans le développement de l'obésité est connu. Les défauts génétiques identifiés sont soit une atteinte de gènes uniques et rares induisant de l'obésité

sévère et ce, dès l'enfance, ou une atteinte des gènes communs entre les individus qui induisent une prédisposition à développer de l'obésité dans un environnement favorable dit « obésogène » (Lyon 2005). Les formes les plus communes d'obésité ont été caractérisées comme ayant une origine multi-génique : on parle d'obésité polygénique. Ainsi, un nombre très important de gènes ou de loci du génome humain a été associé à des phénotypes obésogènes (Rankinen 2006). C'est le cas pour les gènes dit économes ou d'épargne. Dans cette théorie darwiniste, des mutations de ces gènes, au cours de l'évolution, confèrent un avantage évolutif aux personnes porteuses (Neel 1962). En effet, les mutations sont à l'origine d'une utilisation optimisée des lipides alimentaires et donc, en période de famine, présentent un avantage certain. Seulement, pendant des périodes de pléthore, comme celle que nous connaissons actuellement, ces mutations, qui favorisent le stockage des lipides, présentent surtout des inconvénients.

Une autre cause est l'épigénétique. Elle correspond à l'étude des changements héritables de l'expression génique indépendants de l'altération de la séquence nucléotidique de l'ADN. A cause de leur réversibilité, ces changements sont fortement soumis aux modifications de l'environnement. Les modifications épigénétiques les plus étudiées sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation…) (Junien 2005). Ainsi, des états nutritionnels particuliers (carences protéiques, régimes hyperlipidiques…) pendant la période pré-natale peuvent entraîner des modifications épigénétiques qui conduisent à des troubles métaboliques à l'âge adulte, comme le diabète de type 2 ou encore l'obésité (Dhasarathy 2016).

Aux facteurs génétiques précédemment discutés, s'ajoutent les facteurs environnementaux qui peuvent, à différents niveaux d'importance, favoriser le développement de l'obésité chez des personnes non prédisposées génétiquement. L'inverse est aussi vrai : des conditions environnementales favorables peuvent prévenir l'obésité chez une personne prédisposée génétiquement. Les facteurs environnementaux comportent une multitude de

déterminants étroitement liés à l'obésité: le statut socioéconomique faible, le milieu rural, la cessation tabagique, la surconsommation d'alcool, le manque de sommeil, l'inactivité physique, la sédentarité et les mauvaises habitudes alimentaires (Befort 2012 ; Beccult 2011 ; Lee 2012).

La principale cause permettant d'expliquer l'épidémie actuelle d'obésité est l'alimentation et plus particulièrement le déséquilibre des apports énergétiques par rapport aux dépenses. L'offre alimentaire a radicalement changé depuis les dernières décennies (Elmadfa 2012). De plus, près de 30% des dépenses alimentaires hebdomadaires des ménages sont expliquées par les repas achetés dans les restaurants (Bernstein 2010). En contrepartie, le niveau socioéconomique est l'un des facteurs le plus fortement associé à la qualité de l'alimentation et à l'obésité (Teo 2013). Le coût monétaire est un déterminant majeur des choix alimentaires, où les aliments sains sont généralement plus coûteux que ceux riches en calories, en matières grasses, en sucre et/ou en sodium (Teo 2013). Même si l'urbanisation, la modernisation, la sédentarité et l'inactivité physique sont des facteurs tous étroitement liés à l'obésité, il reste que la facilité d'accès aux aliments à densité calorique élevée, aux larges portions et aux boissons sucrées sont des facteurs pouvant facilement expliquer la surconsommation de calories. Cet accroissement est en partie expliqué par les aliments ultra transformés qui sont appétissants, accessibles, bon marché et largement publicisés et donc qui favorisent la surconsommation de calories et le développement de l'obésité (Vandevijvere 2015). La quantité de protéines consommée semble rester stable, il y a une diminution de la consommation de glucides (due essentiellement aux glucides complexes) en faveur des lipides. Cette inversion de tendance de consommation, qui a débuté à la révolution industrielle, s'est accélérée vers 1960, correspondant au développement des industries agro-alimentaires et des grandes surfaces alimentaires. D'une manière intéressante, cette augmentation de la consommation de lipides ces 30 dernières années correspond au développement massif de l'épidémie d'obésité dans notre pays. Cependant, bien plus que le déséquilibre quantitatif des apports en lipides, c'est l'existence d'un déséquilibre qualitatif qui est incriminé. En effet, il

existe dans les apports élémentaires des français, décrit par l'Etude SUVIMAX, un déficit d'acides gras mono-insaturés (AGMI) en faveur des acides gras saturés (AGS). De plus, une forte part des acides gras poly-insaturés (AGPI) consommés sont de la famille des omégas 6, qui favorisent l'adipogenèse, alors que ceux de la famille des omégas 3, dont le rôle cardio-protecteur a été démontré, sont très peu consommés (Simopoulos 2008). Ainsi, le rapport oméga 6 / oméga 3, qui devrait être de 4, est en réalité de 17, confirmant un réel déséquilibre qualitatif.

La flore intestinale semble également jouer un rôle dans l'apparition de l'obésité. En effet, une étude concernant l'écologie de la flore intestinale chez la souris a permis de montrer qu'une souris "germ-free" à qui l'on inocule une flore intestinale normale voit sa masse adipeuse augmenter de 60% et ceci malgré une diminution de la consommation alimentaire. Par des mécanismes complexes, la flore intestinale inoculée aux souris favorise la production hépatique de triglycérides (TG), dont le stockage est facilité par une absence d'inhibition de la lipoprotéine lipase (LPL). Les auteurs proposent que le régime alimentaire actuel des pays développés, le « Western-diet », pourrait favoriser le développement de souches particulières au niveau de la flore intestinale, prédisposant ainsi les individus a des risques accrus de développer une obésité (Bäckhed 2004). Ces résultats ont été par la suite confirmées chez l'homme, et donnant un rôle important de celle-ci dans le développement de l'obésité (Martinez 2016).

Enfin, à la base, le poids est régulé par un système neurohormonal très complexe. Essentiellement, les signaux impliqués dans la régulation homéostatique de la prise alimentaire et dans la balance énergétique sont intégrés au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (Sumitthran 2013), de la partie caudale du tronc cérébral ainsi qu'au niveau du cortex et du système limbique (Lenard 2008). Un nombre important de neuropeptides et d'hormones sont impliqués dans la régulation de l'appétit et agissent dans la région centrale de l'hypothalamus. Leur action est soit orexigène, c'est-à-dire qui stimule l'appétit, ou soit anorexigène, donc qui

inhibe l'appétit. Au final, des boucles de rétroaction sont créées entre le cerveau et les organes cibles en périphérie incluant le tractus gastro-intestinal, le pancréas, le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux (Lenard 2008). La régulation à court, moyen et long terme de la prise alimentaire comprend des mécanismes complexes incluant un nombre important d'hormones peptidiques soit orexigènes ou anorexigènes. En dépit de l'homéostasie dans les mécanismes régulant la faim et la satiété, les signaux hédoniques peuvent surpasser cet équilibre et accentuer le désir de manger des aliments avec une densité énergétique élevée et donc favoriser la surconsommation d'aliments et le gain de poids (Hall 2014). La surconsommation d'aliments hautement palatables, riches en sucres et en graisses, a été identifiée comme étant un des facteurs de risque de surpoids et d'obésité. Ces aliments s'avèrent fortement attractifs, tant chez l'homme que chez le rongeur *(rats, souris),* en raison de la satisfaction hédonique qu'ils procurent. Les sujets obèses ont tendance à plus consommer les aliments riches en lipides que les sujets minces (Blundell 2000). On a longtemps considéré que la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires était uniquement dépendante de leur texture et de leurs caractéristiques olfactives. L'identification récente de lipido-récepteurs (CD36, GPR120) au niveau des bourgeons du goût chez le rongeur et chez l'homme suggère que les lipides pourraient également être perçus par la voie gustative (Laugurette 2005 ; Simons 2011). Nous savons que la perte de poids modifie le comportement alimentaire, notamment pour le gras et le sucré (Berthoud 2012).

L'origine de ce comportement n'est pas totalement élucidée. L'analyse du système nerveux central par IRM fonctionnelle indique que le circuit de la récompense, responsable du plaisir alimentaire, est perturbé au cours de l'obésité (Stoeckel 2008). Nous savons que la perte de poids modifie le comportement alimentaire, notamment pour le gras et le sucré (Berthoud 2012).

Les adaptations physiologiques aux variations de poids sont complexes et regroupent une multitude de mécanismes. Or, leurs points en commun sont que tous accentuent la difficulté à maintenir la perte de poids et prédisposent au regain de poids. Au final, ces adaptations favorisent une situation de quasi non-retour et d'échec dans la capacité à perdre du poids et à le maintenir, principalement chez les personnes qui ont, au courant de leur vie, effectué plusieurs régimes dans le but de perdre du poids. Ce cercle vicieux est étroitement impliqué dans le développement de l'obésité sévère.

1.5. Impact de l'obésité et ses conséquences notamment métabolique

L'obésité est une maladie chronique qui nécessite une prise en charge au long cours. Ses conséquences sur la santé sont nombreuses, allant d'un risque accru de décès prématuré à plusieurs maladies non mortelles ayant des effets indésirables sur la qualité de vie. Ce chapitre a pour but d'énumérer les différentes complications et syndromes métaboliques associées à l'obésité ainsi que leur prévalence.

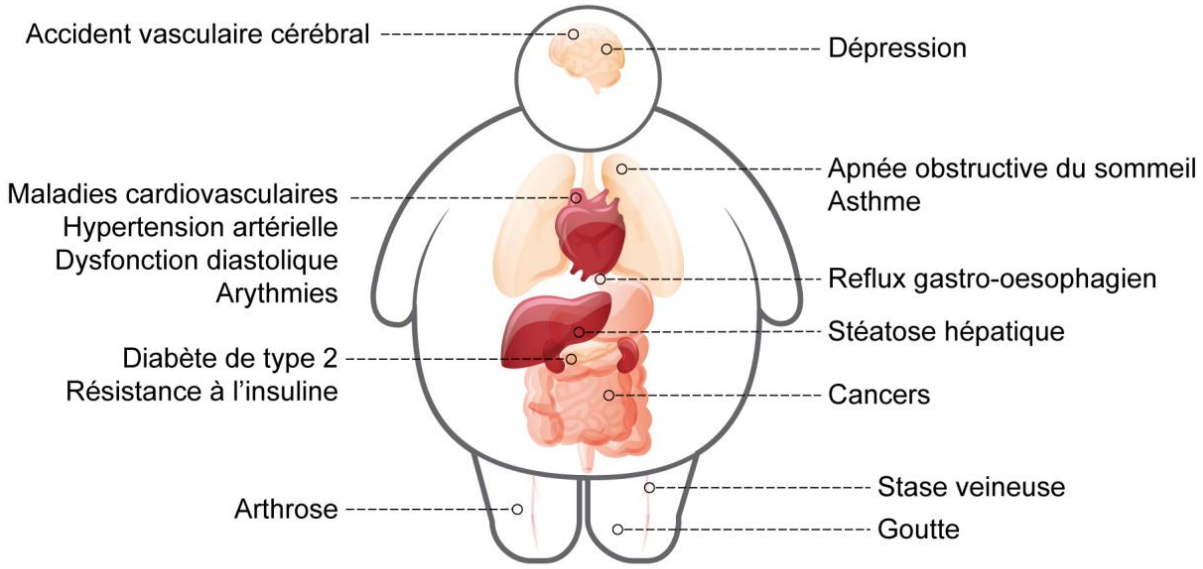


Figure 1 : Principales comorbidités associées à l'obésité

1.5.1. Impact de l'obésité sur la mortalité

D'après l'étude de Framingham, publié en 2003, l'obésité à l'âge de 40 ans réduit l'espérance de vie de 7,1 ans chez les femmes et de 5,8 ans chez les hommes non-fumeurs (Peeters 2003). L'étude réalisée par Whitlock en 2009 montre quant à elle, sur 894 576 patients qu'avec un BMI entre 30-35 kg/m^2, l'espérance de vie est diminuée de 2 à 4 ans et à un BMI entre 40-45 kg/m^2, l'espérance de vie de 8 à 10 ans par rapport à une population normale (Whitlock 2009). Ces données sont confirmées dans une étude récente d'épidémiologie (Stenholm 2016). Une donnée nouvelle montre quant à elle que les patients obèses diabétiques vivent 2.8 ans de plus pour les hommes et 5.3 ans de plus pour les femmes que les patients obèses non diabétiques, probablement dû à un meilleur suivi médical (Dhana 2016). Ces données renforcent le rôle important de la prise en charge de l'obésité et des complications afin d'augmenter l'espérance de vie de ces malades (Flegal 2013).

1.5.2. Impact de l'obésité sur le cancer

En 2014, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a montré que près d'un demi-million de nouveaux cas de cancer par an pouvaient être attribués à la surcharge pondérale. Le surpoids et l'obésité sont devenus des facteurs majeurs de risque de développer un cancer, responsables d'environ 3,6% (481 000) des nouveaux cas de cancer en 2012. La proportion de cancers liés à l'obésité est plus élevée chez les femmes (5,4 %) que chez les hommes (1,9 %), en raison surtout du nombre élevé de cancers spécifiquement féminins (sein après la ménopause, utérus) qui ont une origine hormonale importante en lien avec la surcharge pondérale (CIRC/IARC, 2014) (Bhaskaran 2014). L'obésité favorise un état inflammatoire chronique qui se traduit par une augmentation des taux sanguins de facteurs pro-inflammatoires tels que le Tumor-Necrosis Factor-α (ou TNFα), l'interleukine 6 (IL-6), la protéine C-réactive et la leptine (Debnatt 2016). La présence de ces facteurs a pour conséquence de favoriser la prolifération cellulaire et le processus d'initiation de la cancérogenèse (INCa, 2013). Chez les sujets ayant un IMC élevé, on observe également une augmentation des taux endogènes de plusieurs hormones, facteurs de croissance, cytokines : insuline, leptine, hormones sexuelles. Certains mécanismes sont communs à toutes les localisations de cancers, tels que l'augmentation de la résistance à l'insuline due à l'excès de tissus adipeux. D'autres mécanismes semblent plus spécifiques de certaines localisations. C'est le cas des modifications hormonales en cause dans certaines localisations, par exemple pour les cancers du sein et de l'endomètre. De nombreuses études décrivent l'existence d'une relation démontrée entre obésité et augmentation de risque de cancers. L'augmentation de cinq points de l'IMC a été associée à un risque accru de certains types de cancer, comme celui de l'utérus, la vésicule biliaire, le foie, le col de l'utérus, la thyroïde et la leucémie (Whiteman 2016). Des valeurs d'IMC trop élevées augmenteraient également le risque global de cancer du foie, du côlon et de l'ovaire. Enfin, le surpoids ou l'obésité au moment du diagnostic de cancer du sein et la prise

de poids sont associés à un risque accru de récidive, de développement d'un second cancer et de mortalité liée au cancer initial. Afin de prévenir ces risques, il est important de maintenir une activité physique régulière et de privilégier une alimentation diversifiée à faible densité énergétique. Dans une étude prospective (Calle 2003) ayant inclus plus de 900 000 adultes en 1982 suivis pendant 16 ans, 57 145 décès par cancer survenaient pendant la période de suivi. Les auteurs étudiaient le risque de cancer en fonction de l'IMC à l'inclusion dans un modèle d'analyse multivariée. Pour les sujets ayant un IMC égal ou supérieur à 40 kg/m², le risque relatif de décès par cancer était de 1,52 [1,13-2,05] chez l'homme et de 1,62 [1,40-1,87] chez la femme ; le risque relatif de décès par cancer colorectal était de 1,84 [1,39-2,41] chez l'homme (pour un IMC ≥ 35 kg/m2) et de 1,46 [0,95-2,24] chez la femme (pour un IMC ≥ 40 kg/m2) et le risque relatif de décès par cancer de l'utérus de 6,25 [3,75-10,42].

1.5.3. Impact de l'obésité sur le diabète

Le changement d'alimentation en faveur d'une plus grande consommation de produits riches en graisse et en sucre ainsi que la tendance à la sédentarisation observés au niveau mondial jouent un rôle incontestable dans l'émergence de cette pathologie. Le diabète de type 2 est la complication majeure de l'obésité et on estime que 80 à 90% des diabétiques sont obèses. L'Organisation Mondiale de la Santé évalue à 347 millions le nombre d'individus diabétiques et prévoit qu'en 2030 le diabète sera la septième cause de décès dans le monde (OMS 2015). Cette pathologie est définie par une hyperglycémie chronique (≥ 126 mg/dl ou 7 mmol/l à jeun) provoquée par des altérations du métabolisme glucidique et responsable de nombreuses complications microcirculatoires (neuropathies, rétinopathies, néphropathies). La dérégulation de la glycémie résulte, d'une part, d'un défaut d'action de l'insuline à stimuler le captage du glucose par le tissu adipeux et les muscles squelettiques ainsi qu'à inhiber la production

endogène de glucose, et d'autre part, d'anomalies de la sécrétion d'insuline par le pancréas endocrine. L'obésité centrale avec accumulation de graisse viscérale sécrétant des adipokines proinflammatoires, de même que la quantité de masse musculaire par sa capacité d'absorption de la charge en glucose, influencent la sensibilité à l'insuline (Kim 2004). L'obésité abdominale (androïde) était associée à un sur-risque de diabète, d'athérosclérose et de goutte. Des données de la littérature suggèrent que l'accumulation de graisse viscérale augmente la concentration d'Acide Gras Libres (AGL) dans la veine porte, résultant en une diminution de la sensibilité à l'insuline (Boden 2003). De plus, l'accumulation d'AGL dans la veine porte augmente la synthèse et l'excrétion de glucose et de TG dans le foie (Svedberg 1990) et diminue l'utilisation du glucose par le muscle, contribuant à l'insulino-résistance (Randle 1963).

Dans l'étude ObépiRoche 2012 réalisée en France, 5,8% des adultes de 18 ans et plus déclarent être traités pour un diabète, régime seul compris; 0,3% pour un diabète de type 1 ou indéterminé, et 5,5% pour un diabète de type 2. Les hommes sont plus fréquemment diabétiques (6,7%) que les femmes (4,9%) $p<0,01$. Près de 3 fois plus de personnes déclarent un diabète traité pharmacologiquement ou sous régime seul en cas de surpoids, 7 fois plus en cas d'obésité versus des sujets de corpulence normale. Parmi les diabétiques de type 2, 43,1 % sont obèses. On observe un écart important de ce taux selon le sexe puisque 39,9 % des hommes diabétiques de type 2 sont obèses contre 47 % des femmes diabétiques de type 2.

1.5.4. Impact de l'obésité sur le syndrome d'apnée hypopnée obstructif du sommeil et asthme

Une apnée est caractérisée par un arrêt du flux aérien d'une durée supérieure ou égale à 10 secondes, la reprise respiratoire coïncidant habituellement avec un éveil très bref ou l'allègement du sommeil. A côté de l'apnée on définit une forme incomplète, l'hypopnée qui se traduit par une diminution du flux respiratoire d'au moins 50 %, associée à une désaturation de l'hémoglobine en oxygène égale ou supérieure à 4%. Sur le plan polysomnographique, le syndrôme d'apnée hypopnée obstructif du sommeil (SAHOS) se définit par un index d'apnée supérieur à 5 (nombre d'apnées par heure de sommeil) ou un index d'apnée-hypopnée supérieur à 10 (nombre total d'apnées ou d'hypopnées par heure de sommeil). Les SAHOS peuvent s'observer à n'importe quel âge. Avant 60 ans ils touchent essentiellement les hommes, au-delà les femmes sont aussi atteintes. Leur incidence dans la population générale est mal connue, elle est actuellement estimée dans une fourchette allant de 0,3 à 5 %. Le SAHOS est responsable d'une mortalité de 11 % à 5 ans avec notamment un haut risque cardiovasculaire (Partinen 1988). Il est important de le diagnostiquer précocement, non seulement en raison du danger que court le malade sur le plan cardio-respiratoire mais aussi du fait des répercussions neuropsychiatriques, sociales et professionnelles. Nous savons chez les obèses, que 70% des patients présentent un SAHOS (Malhotra 2002). Celui-ci est majoré lors d'une prise de poids rapide.

L'asthme quant à lui, semble être augmenté chez les patients obèses, dû probablement à un état inflammatoire systémique en lien avec l'obésité, notamment avec un rôle important des adipokines (Muc 2016). La méta analyse de Buchwald en 2007 montre que 25% des patients obèses présentent un asthme (Buchwald 2007). Des recherches sont en cours pour comprendre

et permettre une meilleure prise en charge chez ces patients qui souvent présentent un asthme sévère (Leinaar 2016, Barros 2016).

1.4.5. Impact de l'obésité sur le risque cardio-vasculaire et l'hypertension artérielle

Les patients obèses présentent un risque accru d'hypertension artérielle (HTA) par rapport aux patients non obèses (Abdullah 2014). Les tensions systoliques et diastoliques augmentent toutes deux avec l'IMC (Organisation mondiale de la santé, 2003). Dans l'étude Obépi 2012, la prévalence de l'HTA traitée est de 17,6%. Cette prévalence augmente avec l'âge. En 2012, le risque d'être traité pour hypertension artérielle est multiplié par 2,3 chez les sujets en surpoids et par 3,6 chez les personnes obèses par rapport aux sujets dont l'IMC est inférieur à 25 kg/m². Outre l'association positive à un certain nombre de facteurs de risque cardio-vasculaires, l'obésité serait un facteur de risque indépendant des cardiopathies coronariennes (Organisation mondiale de la santé, 2003).

1.5.6. Obésité et syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est une entité physiopathologique regroupant les désordres métaboliques multiples en lien avec l'obésité et prédisposant au diabète de type 2 et aux risques cardiovasculaires. Historiquement, dès 1923, Kylin décrivait un syndrome associant hypertension artérielle, hyperglycémie et hyperuricémie (Nilsson 2001). Dans les années 1950 Jean Vague rapporte un lien entre obésité androïde et diabète (Vague 1956), décrivant l'association fréquente du diabète avec l'athérosclérose et la goutte expliquée selon lui par les troubles circulatoires, l'emphysème pulmonaire et le vieillissement prématuré dû à l'obésité.

C’est finalement en 1988 que Reaven décrit le Syndrome X également appelé syndrome dysmétabolique caractérisant ainsi les désordres métaboliques chez les patients insulinorésistants (Reaven 1988). Ce syndrome est né de l’hypothèse que la résistance à l’insuline est fréquemment observée chez des sujets apparemment sains mais qui sécrètent suffisamment d’insuline pour compenser son défaut d’action, les préservant ainsi de l’état d’intolérance au glucose. Cependant, cette hyperinsulinémie compensatrice est responsable d’une stimulation de la sécrétion de VLDL par le foie conduisant à une hypertriglycéridémie périphérique et une augmentation du risque cardio-vasculaire. Ainsi, ce syndrome regroupait initialement l’intolérance au Glucose, l’hyperinsulinémie compensatrice, l’augmentation des VLDL et des Triglycérides (TG), et une baisse du HDL-cholestérol, l’insulino-résistance étant à la base de la physiopathologie sous-jacente. Depuis l’introduction du concept de Syndrome X, de nombreuses découvertes relatives au rôle de l’insulino-résistance dans la pathologie cardio-vasculaire ont fait évoluer la définition : l’hypertension artérielle a d’abord été ajoutée aux paramètres de ce syndrome suite à de nombreux travaux de recherche clinique ayant mis en évidence une association entre hyperinsulinémie, intolérance au glucose et hypertension artérielle. Ainsi, le syndrome X a évolué vers le syndrome d’insulino-résistance caractérisant toutes les anomalies métaboliques et les symptômes cliniques en lien avec la résistance à l’insuline et l’hyperinsulinémie.

La définition par l’*International Diabetes Federation* (IDF) du syndrome métabolique associe une obésité centrale (définie pour les personnes d’origine européenne par un tour de taille supérieur à 94 cm chez l'homme et à 80 cm chez la femme) et deux des quatre facteurs suivants (International Diabetes Federation, 2006) :

- Élévation des triglycérides (>1,50 g/l) ou l’existence d’un traitement spécifique
- Abaissement du HDL-cholestérol (HDL-c) (<0,40 g/l chez l'homme, 0,50 g/l chez la femme) ou l’existence d’un traitement spécifique

- Élévation de la pression artérielle (>130/85 mmHg) ou l'existence d'un traitement pour une hypertension précédemment diagnostiquée
- Hyperglycémie à jeun (1 g/l) ou diabète de type 2 précédemment diagnostiqué

Depuis quelques années, une nouvelle notion est apparue, conséquence de l'obésité et du syndrome dysmétabolique : les LDL petites et dense, très athérogènes. La formation des particules LDL petites et denses fait partie intégrante des voies endogènes et exogénes des lipides. Ce mécanisme revêt toute son importance dans le fait que les LDL petites et denses sont les particules LDL les plus athérogènes. La Cholesterylester transfer protein (CETP) permet l'échange d'ester de cholestérol des LDL et des HDL vers les VLDL, en échange de TG, ce qui rend alors les particules LDL plus riches en TG. Plus les VLDL seront riches en TG, plus il y aura de TG pouvant être transférés aux LDL. Aussi, la particule LDL enrichie en TG est alors un meilleur substrat pour la lipase hépatique (LH) et pour la lipase endothéliale (LE) que les particules LDL moins riches en TG. La LH et la LE remodèlent alors la particule LDL en hydrolysant ses TG et en la rendant alors encore plus petite et plus dense (Phillips 2015).

Ces différentes voies seront développées dans le chapitre 3.

1.5.7. Impact de l'obésité sur la qualité de vie et les troubles psychiatriques

L'obésité peut entraîner des handicaps physiques et des difficultés d'insertion dans les lieux de vie communs : regard des autres, lieux de transport, difficultés d'insertion professionnelle, d'accès aux droits. Elle est également source de déstabilisation psychosociale et de souffrances psychiques qui peuvent être graves et difficiles à traiter (Jantaratnotai 2016). Une étude en population sur 40 000 individus réalisée entre 1988 et 1994 a montré que les patientes obèses (IMC ≥ 30 kg/m2) avaient 1,8 fois plus de risque de faire un épisode de

dépression majeur dans le mois précédent que les femmes de poids moyen (IMC entre 18,5 et 25) ; les patients (hommes ou femmes) avec IMC ≥ 40 kg/m2 avaient 5 fois plus de risque defaire un épisode de dépression majeur dans le mois précédent que les individus de poids moyen (OR = 4,98 ; $IC_{95\%}$ [2,07-11,99]) (Onyike 2003). Des travaux plus récents ont confirmé ces résultats, notamment sur l'altération de la qualité de vie à la fois physique et mentale (Nigatu 2016) mais aussi sur la mauvaise qualité de sommeil, accentuant encore plus l'anxiété, l'asthénie et la dépression (Araghi 2013).

1.5.8. Impact de l'obésité sur la dyslipidémie

La dyslipidémie liée à l'obésité est caractérisée par une élévation du cholestérol, du LDL-cholestérol (LDL-c), des apolipoprotéines B, des triglycérides et une baisse du HDL-cholestérol (HDL-c) (OMS2003). Dans l'étude ObépiRoche 2012, l'obésité multipliait par 2,7 le risque d'être traité pour dyslipidémie et le surpoids par 2,2. (Obépi 2012). Dans cette même étude, 17,2% des hommes et 14,7% des femmes ($p<0,01$) déclaraient être traités pour un excès de cholestérol ou de triglycérides. La plupart du temps, la dyslipidémie ne se présente pas seule mais est souvent associée à l'hypertension ou présente dans le syndrome métabolique (chapitres 1.4.5 et 1.4.6).

1.5.9. Impact de l'obésité sur les pathologies ostéo-articulaires

Le risque de survenue d'une arthrose est augmenté dès que l'IMC est supérieur à 25 kg/m² (Buchwald 2007). Les symptômes ostéo-articulaires favorisent la sédentarité et limitent les possibilités d'activité physique (HAS, 2008). Malheureusement, il s'agit d'un cercle

vicieux, car la sédentarité favorise et majore l'obésité. Une étude récente portant sur la database espagnole, portant sur 1 764 061 patients a montré que l'incidence de l'arthrose concernant le genou, la hanche et la main était respectivement chez les patients de poids normal de 3,7 ($IC_{99\%}$ [3,6-3,8]), 1,7 ($IC_{99\%}$ [1,7-1,8]), et de 2,6 ($IC_{99\%}$ [2,5-2,7]), par contre elle était de 19,5 ($IC_{99\%}$ [19,1-19,9]), 3,8 ($IC_{99\%}$ [3,7-4,0]), et 4,0 ($IC_{99\%}$ [3,9-4,2]), chez les patients obèses avec un IMC > 35kgs/m^2 (Reyes 2016).

1.5.10. Impact de l'obésité sur les pathologies digestives

L'obésité est associée avec une fréquence élevée de lithiases biliaires, de reflux gastro-oesophagiens et de stéatoses hépatiques (Buchwald 2007, HAS 2008). Dans une étude récente portant sur 596 patients obèses, 33% des patients présentaient des symptômes digestifs (constipation, intestin irritable, diarrhées, reflux,…) (Bouchoucha 2015).

La modification des fonctions digestives suite à l'obésité sera détaillée dans le chapitre suivant (Chapitre 3.5). Ces symptômes doivent bien sûr être pris en compte dans la prise en charge de ces patients, et notamment pour les patients suivis dans le cadre d'une chirurgie bariatrique, celle-ci pouvant entraîner des modifications des fonctions digestives.

1.6. Recommandations de l'HAS pour la prise en charge de l'obésité

1.6.1. Prise en charge médicale

La stratégie thérapeutique de l'obésité est une prise en charge globale, pluridisciplinaire, et sur le long terme, visant à l'obtention d'une perte de poids et au traitement des complications associée. Elle repose initialement sur les conseils diététiques, l'activité physique, la prise en charge des troubles du comportement alimentaire, et le traitement des éventuelles comorbidités. Le traitement médicamenteux n'a en revanche que peu d'indications car n'ayant pas démontré d'efficacité (Garvey 2016). Seul l'orlistat est encore sur le marché. L'échec d'un traitement médical de plus de 6 mois bien conduit chez des sujets adultes avec IMC $\geq$ 40 kg/m^2 ou $\geq$ 35 kg/m^2 associés à des complications métaboliques, conduit de plus en plus souvent à proposer un traitement chirurgical (données PMSI 2013). Pour prévenir le surpoids et l'obésité, il est recommandé de pratiquer quotidiennement au moins 30 minutes d'activité physique d'intensité modérée comparable à la marche rapide (qu'on peut fractionner en 3 fois 10 minutes) et limiter les activités sédentaires (ordinateur, télévision…) ; de consommer peu d'aliments à forte densité énergétique, de privilégier les aliments à faible densité énergétique et de surveiller le poids de façon régulière (une fois par mois). L'étude de Villereal et al en 2011, portant sur 93 patients, publié dans le New England met en évidence que l'exercice associé à un régime hypocalorique est plus efficace que le régime seul, sur la fonction physique et la perte de poids (Villareal 2011). La France a mis en place depuis plusieurs années des plans et programmes de santé publique soit par déterminants de santé, soit par pathologies. Le Plan Obésité 2010-2013 http://www.sante.gouv.fr/plan-obesite.html a permis la mise en place de centres spécialisés de prise en charge. Au nombre de 37, ces centres spécialisés sont répartis dans toutes les régions de France. Ils disposent d'équipes médicales multidisciplinaires et de l'équipement adapté à la prise en charge des patients atteint d'obésité sévère. Parallèlement, le Programme national

nutrition santé (PNNS) a pour objectif d'améliorer l'état de santé de la population en agissant sur les facteurs nutritionnels.

1.6.2. La prise en charge chirurgicale

Le traitement chirurgical n'est proposé en France qu'en seconde intention, après échec du traitement médical bien suivi pendant 6 à 12 mois, dans le cas d'obésité morbide avec un IMC ≥ 40 kg/m2 ou avec un IMC ≥ 35 kg/m2 associé à des comorbidités (HTA, diabète, SAHOS, maladies osteo-articulaires invalidantes…) (recommandations de la Haute Autorité de Santé). L'indication d'une chirurgie bariatrique est posée par une décision collégiale, prise après discussion et concertation pluridisciplinaire, chez des patients adultes réunissant l'ensemble des conditions. Avant chirurgie bariatrique, les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) publiées en 2009 sont :

- Réaliser des mesures anthropométriques : IMC, tour de taille.
- Préciser le statut nutritionnel et vitaminique des patients : dosages d'albumine, hémoglobine, ferritine et coefficient de saturation en fer, de la transferrine, calcémie, vitamine D, vitamines B1, B9, B12. Des dosages supplémentaires pourront être réalisés en cas de point d'appel clinique ou biologique. En cas de déficit ceux-ci devront être traités. D'éventuels facteurs favorisant les déficits devront être recherchés et également traités.
- Evaluer avec le patient son comportement alimentaire. Il faut rechercher l'existence d'un trouble du comportement alimentaire (historique, sévérité du trouble) et d'éventuels troubles mentaux associés (dépression, troubles psychotiques, addictions, etc.). Il est recommandé d'en tenir compte dans l'indication de la chirurgie mais aussi dans la prise en charge pluridisciplinaire pré et postopératoire (psychothérapie, médicaments, surveillance des complications mécaniques dans le cas de l'anneau, etc.).

- Evaluer et prendre en charge les comorbidités cardiovasculaires ou métaboliques, notamment l'HTA, le diabète de type 2, les dyslipidémies.
- Dépister les maladies endocriniennes pouvant être responsables de l'obésité.
- Evaluer le risque thromboembolique. Rechercher et prendre en charge un SAHOS selon les recommandations en vigueur, un tabagisme ou d'autres pathologies respiratoires.
- Réaliser un bilan hépatique qui doit comporter au minimum un dosage des transaminases et de gammaGT à la recherche d'une stéato-hépatite non alcoolique. En fonction des résultats une consultation en hépatologie sera demandée.
- Réaliser une évaluation gastro-intestinale :

  Avant toute intervention de chirurgie bariatrique, il est recommandé, de réaliser une fibroscopie oesogastroduodénale. Elle permet de dépister une infection à Hélicobacter pylori (HP) et de la traiter si nécessaire. Son éradication devra être contrôlée avant la chirurgie. Elle recherche également une autre pathologie de l'estomac associée (hernie hiatale importante, ulcère, gastrite, etc.) pouvant contre-indiquer certaines procédures ou nécessiter une prise en charge préopératoire. Avant une chirurgie excluant l'estomac, il est recommandé de réaliser des biopsies gastriques à la recherche de lésions paranéoplasiques. La suspicion clinique ou paraclinique de troubles moteurs de l'oesophage doit faire discuter la réalisation d'une manométrie oesophagienne avant pose d'un anneau gastrique.
- Evaluer l'état musculo-squelettique et articulaire.
- Evaluer le coefficient masticatoire et l'état dentaire.

Les contre-indications de la chirurgie bariatrique sont :

- Troubles mentaux ou cognitifs sévères qui limitent les capacités du patient à comprendre le procédé chirurgical et à participer à un suivi médical prolongé.
- Dépendance à l'alcool et aux substances psycho-actives.
- Pathologies sévères instables qui rendent le risque opératoire trop important, comme la maladie coronarienne, ou une hypertension portale.
- Maladies mettant en jeu le pronostic vital à court et moyen terme.

On parle de réussite de la chirurgie bariatrique quand la perte excès de poids (PEP) est supérieure à 50%.

L’obésité, plus particulièrement l’obésité sévère, est un facteur de risque à considérer dans le développement des comorbidités précédemment discutées. Actuellement aucun traitement médical et de prise en charge hygiéno-diététique n’est efficace sur le long terme. C’est dans ce contexte, que s’est développée la chirurgie bariatrique. Danc ce second chapitre, nous allons faire un bref rappel historique de la chirurgie bariatrique, puis préciser les techniques chirurgicales actuelles et l’effet de celle-ci d’un point de vue métabolique. Nous n’avons pas étudié par la suite dans nos travaux et donc pas développé dans cette introduction l’impact comportementale, l’appétance alimentaire ou encore les modifications du métabolisme glucidique après chirurgie bariatrique. Nous nous sommes concentrés sur l’effet de la chirurgie bariatrique sur les fonctions digestives, le métabolisme du cholestérol et le rôle des acides biliaires après chirurgie.

2. Chapitre 2 la chirurgie Bariatrique:

2.1.Histoire de la chirurgie bariatrique et historique des interventions

Dans les années 60, aux Etats Unis, naissent les premières interventions chirurgicales pour traiter l'obésité. Elles sont nées du constat que les patients ayant subi d'importantes résections de l'estomac ou de l'intestin grêle perdaient du poids de façon significative (Saber, 2008). Ainsi, il s'agissait de court-circuits initialement jéjuno-coliques mais malgré une perte de poids massive (Payne, 1963 ; Barron, 1969 ; Shibata 1967), le taux élevé de morbi-mortalité a fait abandonner ce procédé. En effet, ces procédures conduisaient à la perte massive de liquides et d'électrolytes et à une dysfonction hépatique sévère.

En 1969, Payne et De Wind publient les résultats de leur technique de bypass jéjuno-iléal ou le jéjunum est sectionné à 35 cm de l'angle de Treitz et le segment proximal anastomosé de façon termino-latérale à l'iléon, 10 cm en amont de la valvule iléo-caecale. Les complications étaient sévères et fréquentes notamment le syndrome de l'anse borgne dû à la stase et à la pullulation microbienne dans l'intestin exclu. Les diarrhées avec hypokaliémies et hypomagnésémie, les dysfonctions hépatiques ainsi que des lithiases urinaires étaient également des problèmes récurrents majeurs (Payne 1969). Les échecs par reflux d'aliments dans l'intestin court-circuité ont fait évoluer la technique (Scott 1971).

Ainsi, Mason décrit en 1969 le bypass gastrique où l'estomac est sectionné dans sa partie proximale, permettant d'obtenir une poche gastrique représentant 10% de son volume, anastomosée de façon latéro-latérale à une anse jéjunale en Oméga (Mason, 1969).

Face aux difficultés techniques pour ascensionner l'anse jéjunale et aux nombreux vomissements bilieux des patients, Griffen décrit en 1977 le bypass gastrique avec Roux-en-Y (Griffen 1977). D'autres techniques encore plus malabsorptives ont été décrites par la suite comme la dérivation biliopancréatique en 1979 par Scopinaro (Scopinaro 1979). Dans cette procédure, on réalise une gastrectomie des 2/3, une anse alimentaire de 1m50 et une anse commune de 1m. En raison des nombreuses complications (fistules anastomotiques, ulcères anastomotiques, anémie, dumping syndrome, diarrhées, flatulences…) et des carences que ces techniques malabsorptives engendraient, des techniques dites restrictives pures se sont développées dans les années 1980.

La première fut la gastroplastie verticale calibrée (GVC) réalisée par Edward Mason (Mason, 1982). Le principe était de réaliser un agrafage vertical de l'estomac au niveau de l'angle de His de façon à confectionner une petite poche gastrique proximale communiquant avec le reste de l'estomac par un orifice calibré par un anneau inextensible. C'est en 1984 que Kuzmak décrit le procédé de cerclage gastrique dont le but est la réduction du calibre de l'estomac et du volume alimentaire, tout en préservant l'anatomie et en étant réversible (Kuzmak 1991). L'anneau, initialement non ajustable a ensuite évolué pour devenir ajustable au moyen d'un ballonnet dont le calibre était modifié par l'injection percutanée d'eau stérile.

Dans les années 1990, le développement de la laparoscopie apporte une révolution dans la chirurgie bariatrique. La laparoscopie apporte en effet un gain majeur en terme de réduction de la morbi-mortalité péri-opératoire (respiratoires, pariétales,…). En 1993, Belashew décrit la 1ère pose d'anneau par voie coelioscopique, avec des résultats rapidement très positifs en termes de perte de poids avec une faible morbidité (Belachew 1993).

La Sleeve gastrectomie (SG), technique restrictive décrite au début des années 2000 par l'équipe de Marceau et Michel Gagner, connaît également une popularité croissante dans le monde (Marceau 1998). Cette procédure consiste en une résection longitudinale du fundus

gastrique avec antrectomie partielle, après calibration du tube gastrique par une sonde. Cette simplicité technique explique en partie son succès. Elle a été initialement décrite comme le 1er temps opératoire de la dérivation bilio-pancréatique (BPD) puis comme le premier acte chirurgical de la BPD dans le cadre d'une stratégie en 2 temps chez les patients avec une IMC > 60 à haut risque de morbi-mortalité périopératoire (Marceau 1993). Le constat de son efficacité majeure en termes de perte de poids (60% de Perte d'Excès de Poids (PEP) rapportée à 2 ans en moyenne) a amené certains auteurs à la proposer comme une procédure bariatrique à part entière en 2005. La Sleeve Gastrectome a été accepté comme procédure unique, par les chirurgiens bariatriques, lors du second concensus international sur la Sleeve Gastrectomie. La Sleeve Gastrectomie est la 1ère technique de chirurgie bariatrique réalisée en France avec 23 976 procédures, soit 43,9% du total des procédures (données PMSI 2013).

En 2001, Rutledge décrit une procédure de bypass gastrique simplifiée, avec une anse en Oméga de 2 mètres et une poche gastrique longue de 20 cm : le mini Bypass (Rutledge 2001). Cette technique est plus rapide car elle ne comporte qu'une seule anastomose digestive, et elle est potentiellement plus facilement reversible (ou révisée). Ses atouts la rendent populaire, mais elle est controversée. En effet, du fait du montage en Oméga, les patients présentent un reflux biliaire dans 10 à 15% des cas, avec un risque d'œsophagite et d'ulcère anastomotique grave. A plus long terme il existe un risque théorique de cancer œsogastrique en lien avec la toxicité du reflux biliaire (Gronnier 2015). Sa moindre morbidité, son efficacité constatée sur le diabète de type 2, et la perte de poids, la rende légitime pour un certain nombre de chirurgiens. Elle a particulièrement fait la preuve de son efficacité chez les patients super obèses, de sexe masculin, à l'obésité androïde, présentant de nombreux facteurs de risques cardio-vasculaires et à fort risque de morbi-mortalité péri-opératoire (Lee 2005).

D'autres procédures, ne rentrant pas dans la pratique courante, ont été décrites et proposées par certains auteurs telle que l'interposition iléale. Dans cette intervention on prélève, à 50 cm de la valvule iléo-caecale, 150 cm d'iléon que l'on interpose à 30 cm de

l'angle duodéno-jéjunal. Ces procédures sont nées de l'hypothèse que l'iléon terminal jouerait un rôle essentiel dans le contrôle du métabolisme glucidique via les cellules L, sécrétant du Glucagon-Like Peptide 1 (GLP1). Rapprocher ces cellules L des stimulis alimentaires serait à l'origine d'une augmentation du GLP1 et d'une amélioration de l'homéostasie glucidique (Oh, 2016). Ce type de procédure, ciblant surtout le métabolisme glucidique plus que la perte pondérale qui reste faible, est l'illustration même du concept de chirurgie métabolique.

La chirurgie bariatrique est en constante évolution. Des procédures disparaissent telle que la Gastroplastie Verticale Calibrée (GVC) très pratiquée dans les années 1990, alors que de nouvelles techniques apparaissent telles que la Sleeve gastrectomie et le mini-bypass, en augmentation croissante depuis 2005. Cette évolution se fait au rythme de l'émergence des nouvelles techniques qui sont approuvées ou réprouvées en fonction des résultats constatés notamment en termes de perte de poids et de résolution des comorbidités. L'impact de ces techniques sur la résolution du diabète de type 2 est l'enjeu principal actuel. Son intérêt majeur en terme de santé publique, est à l'origine du développement de la chirurgie métabolique. Les effets sur les dyslipidémies, encore peu étudiés, restent à comprendre. La méta-analyse de Buchwald, montre que la dyslipidémie est améliorée chez les patients opérés, mais différemment en fonction des techniques chirurgicales (Buchwald 2004). Il existe une baisse plus importante de la concentration en LDL après chirurgie malabsorptive versus chirurgies restrictives. Ces données suggèrent que les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des baisses de cholestérol varient selon les méthodes chirurgicales.

Avant de détailler les effets de la chirurgie bariatrique avec le concept actuel de chirurgie métabolique, nous allons décrire les 5 techniques les plus courantes : l'anneau gastrique, la sleeve gastrectomie, le bypass gastrique selon la méthode du le Roux-en-Y gastric bypass, le mini Bypass et la diversion biliopancréatique. Puis nous décrirons les effets notamment métaboliques après chirurgie, avec les données actuelles de la littérature.

2.2.Les différentes techniques chirurgicales actuelles :

Les chirurgies bariatriques visent à modifier l'anatomie du tractus digestif afin de diminuer la quantité d'aliments ingérés et/ou l'assimilation des nutriments. Elles peuvent être classées en deux catégories : les chirurgies restrictives diminuant le volume stomacal et les chirurgies malabsorptives de type by-pass consistant en un court-circuit de l'intestin et pouvant allier une réduction de la taille de l'estomac, permettant d'être à la fois restrictive et malabsorptive. Aucun arbre décisionnel n'impose une technique chirurgicale pour un type de patients, il existe plutôt une orientation des patients vers telle ou telle type de chirurgie.

2.2.1. L'anneau gastrique

La pose d'anneau gastrique a connu un réel essor durant les deux dernières décennies. Même si le nombre de pose d'anneaux a diminué depuis quelques années au profit de la Sleeve Gastrectomie et du Bypass Gastrique, environ 12 000 anneaux sont encore posés par an en France (données PMSI 2013-2014). La mise en place d'un anneau gastrique reste toujours indiquée dans la prise en charge de l'obésité. Les résultats sont bons à court terme, mais deviennent moins convaincants à long terme (Altieri 2016, Bartlett 2015, Beitner 2016). Dans les années 1990, la pose d'anneau gastrique se faisait en position péri-gastrique, le long de l'estomac. Le risque de dilatation de la poche au-dessus de l'anneau ou « slippage », a progressivement amené les opérateurs à placer les anneaux en position dite « pars-flacida », c'est-à-dire plus éloignés de la paroi gastrique et en englobant le petit épiploon. Le taux de dilatation gastrique ou de « slippage » est ainsi passé de 17-20% à 2-4% (Belachew 2002, Brown 2013, Chevallier 2004, Dargent 2005, Lazzati 2011, Miler 1999). Le consensus actuel est de placer l'anneau en position « pars-flacida » et au-dessus du cardia.

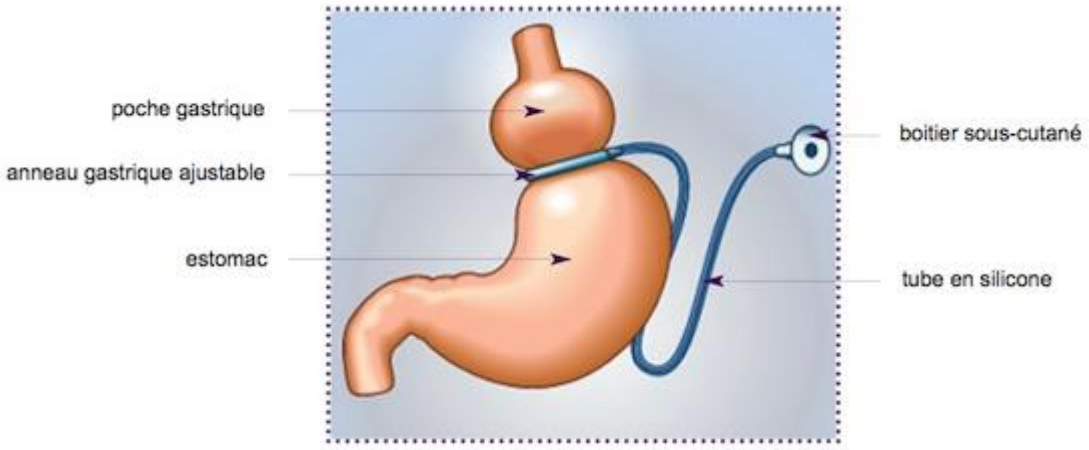


Figure 2 : Technique de l'anneau gastrique

2.2.2. La sleeve gastrectomie

La sleeve gastrectomie consiste en une résection verticale d'environ 2/3 de l'estomac incluant la grande courbure et le fundus. Le volume gastrique est alors ramené à 150-200 mL. La sleeve gastrectomie était initialement associée à la diversion biliopancréatique. Au début des années 2000, les chirurgiens ont proposé une approche chirurgicale en deux temps pour le traitement de patients obèses morbides, avec la sleeve gastrectomie comme chirurgie première, suivie quelques mois plus tard d'une procédure de court-circuit intestinal. Face à la remarquable perte de poids observée dès la première intervention, la sleeve gastrectomie a alors été considérée comme une procédure bariatrique à part entière (Mognol 2005; Silecchia 2006). Cette intervention connait une popularité de plus en plus importante et représente actuellement la procédure bariatrique la plus pratiquée en France (étude 2013 Assurance Maladie, 43.9% des interventions de chirurgie bariatrique).

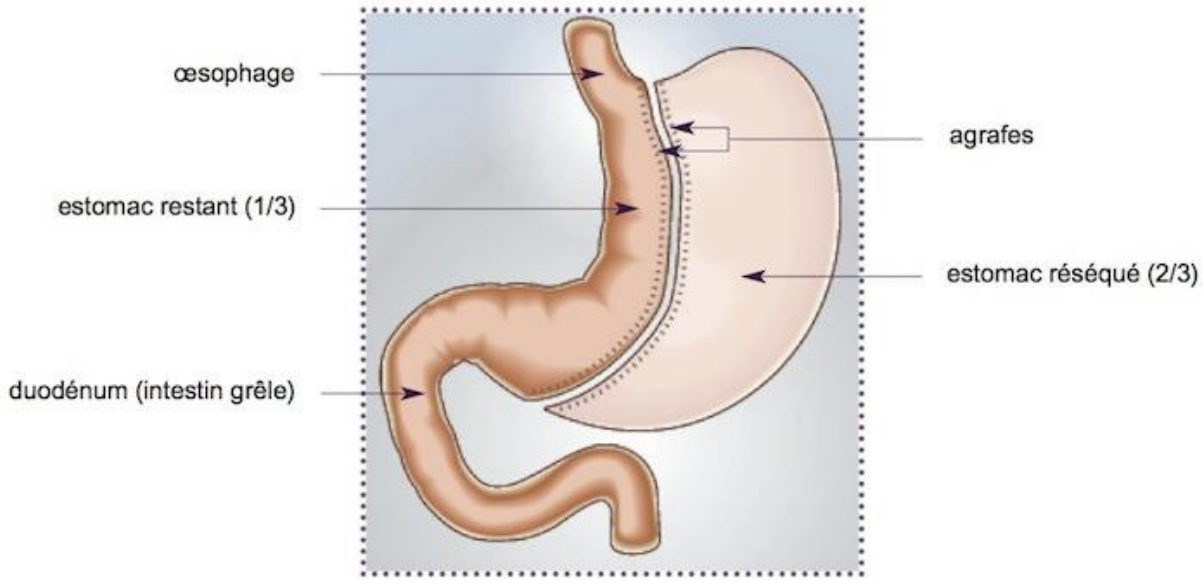


Figure 3 : Technique de la sleeve gastrectomie

2.2.3. Le Roux-en-Y Gastric Bypass

Aux Etats-Unis, dès 1993, Wittgrove décrit le premier bypass gastrique laparoscopique avec Roux-en-Y, intervention qui a subi de nombreuses modifications jusqu'à devenir actuellement le ***gold standard*** de la chirurgie bariatrique en Amérique du nord (Wittgrove 1994). Cette procédure consiste à réaliser une petite poche gastrique d'environ 35cc, anastomosée à une anse alimentaire en Y longue de 120 à 150 cm. L'intestin est alors divisé en trois anses organisées en «Y» : une anse alimentaire d'une longueur d'environ 75 à 150 cm où seuls les aliments transitent ; une anse biliopancréatique permettant le flux des sécrétions gastriques (issues de l'estomac exclu), biliaires et pancréatiques ; et une anse commune correspondant à la jonction des anses alimentaires et biliopancréatique. La perte d'excès de poids moyenne est de 65% à 2 ans et se maintient dans le temps. Son efficacité majeure sur les comorbidités, notamment sur le diabète de type 2, explique sa popularité et l'engouement suscité dans le monde médical et scientifique (Maggard 2005, Buchwald 2004).

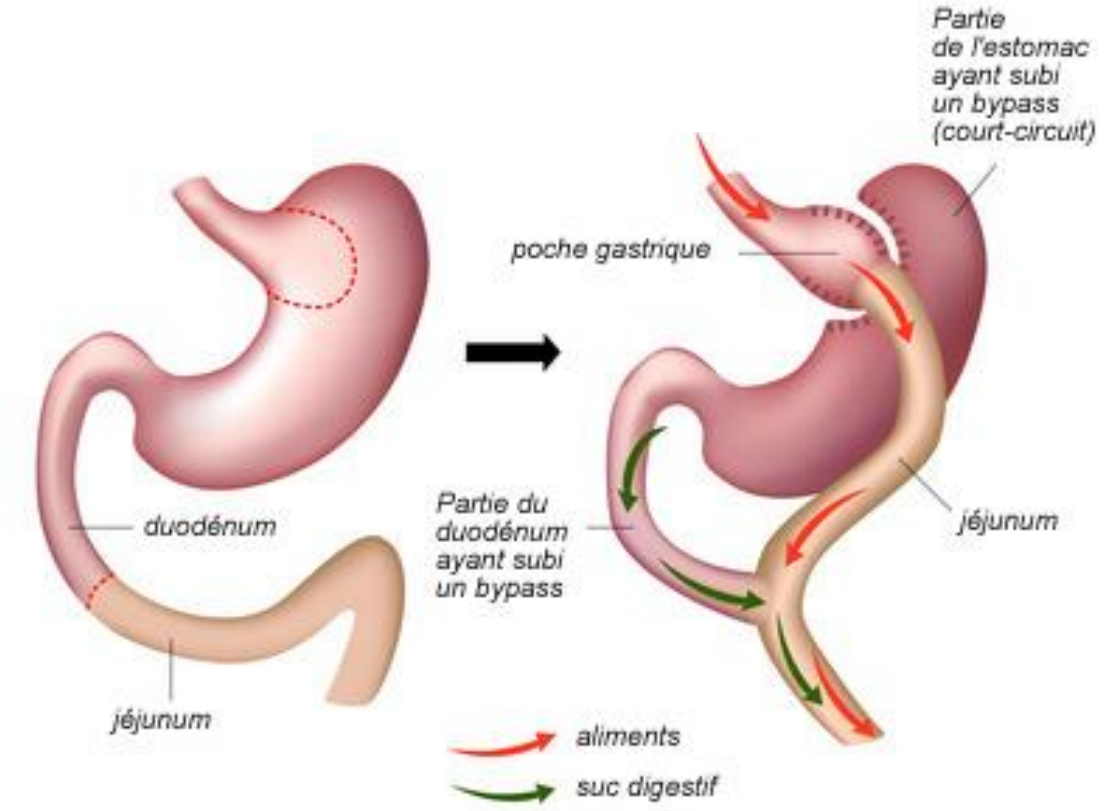


Figure 4 : Technique du Roux-en-Y Gastric Bypass

2.2.4. Le mini Bypass (bypass en oméga)

Le *mini-bypass*, encore appelé *bypass en oméga*, n'est pas *mini* dans son efficacité mais dans sa technique de réalisation (Ruledge 2001). Comme pour le bypass classique, la taille de la partie d'estomac par laquelle les aliments transitent est réduite. Et comme pour le bypass classique, les aliments ne passent pas par une partie de l'intestin, qui est *bypassée* (ou court-circuitée). La différence est que pour obtenir ce résultat le mini-bypass ne nécessite qu'une

seule anastomose (suture) de l'intestin au lieu de deux. La poche gastrique est un peu plus longue que dans le gastric bypass. L'anastomose latéro-latérale est réalisée 2m après l'angle de Treitz, on réalise ainsi une anse bilio-digestive de 2 m que suit une anse alimentaire de la longueur de grêle restant.

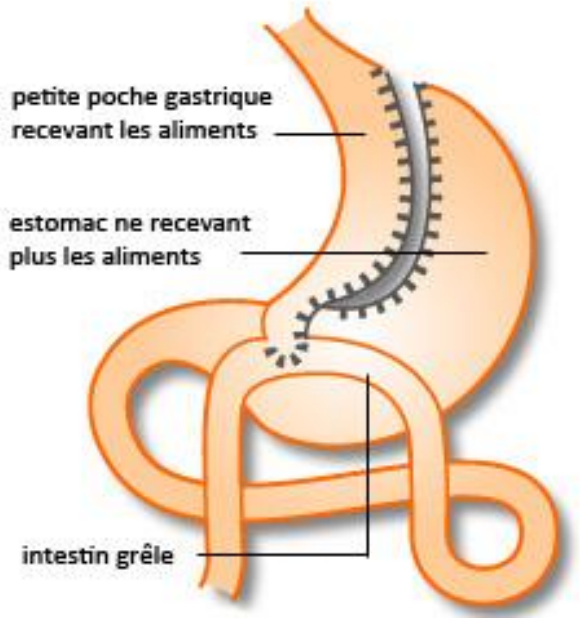


Figure 5 : Technique du mini bypass (bypass en oméga)

2.2.5. La diversion bilio-pancréatique (switch duodénal)

La diversion biliopancréatique a été décrite pour la première fois en 1979 par Scopinaro (Scopinaro 1979). Cette opération consiste tout d'abord à créer une poche gastrique d'environ 200 à 500 ml par gastrectomie horizontale. Puis comme pour le by-pass gastrique selon le Roux-en-Y, l'intestin est organisé en trois anses mais avec une connexion de l'anse bilio-pancréatique à l'anse alimentaire (d'environ 250 cm) à environ 50 cm avant la fin de l'intestin-grêle. La taille de l'anse commune, la portion intestinale dans laquelle les aliments sont mixés avec les sécrétions digestives, est donc considérablement diminuée par rapport à celle du by-pass gastrique selon le Roux-en-Y. La diversion biliopancréatique avec «switch» duodénal a

été conçue en 1998 et correspond à une modification de la diversion biliopancréatique de Scopinaro. Cette procédure inclut une sleeve gastrectomie (Hess and Hess, 1998 ; Marceau, 1998). Le duodénum est sectionné environ 2 cm après le pylore et une anastomose duodéno-iléale est effectuée. La jonction de l'anse alimentaire et bilio-pancréatique est réalisée de sorte que l'anse commune ait une longueur plus importante que celle de la diversion biliopancréatique classique soit environ 100 cm.

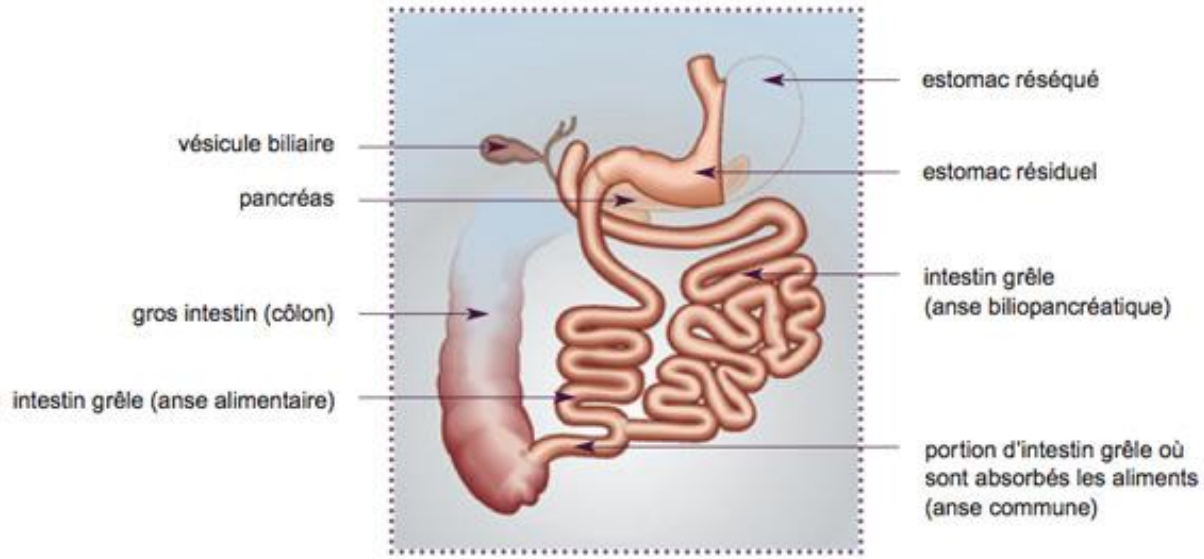


Figure 6 : Technique de la diversion bilio-pancréatique (switch duodénal)

2.2.6. Les modèles animaux de chirurgie bariatrique

Afin de mieux comprendre les effets de la chirurgie bariatrique non attendus, et notamment sur le diabète, différents modèles animaux ont été mis en place chez différentes espèces : le rat, le porc et la souris.

Le modèle utilisé actuellement le plus répandu est le rat, la micro chirurgie y est plus aisée que chez la souris, notamment pour le bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y

Gastric bypass. Par contre, contrairement à la souris, il existe peu de modèles modifiés génétiquement (Arble 2015).

Un autre modèle utilisé, notamment pour étudier les effets sur le métabolisme du glucose est le mini pig. Ce modèle a l'avantage d'être très reproductible et de ne pas nécessiter de microchirurgie. Il est utilisé surtout pour le bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y Gastric bypass. Par contre il s'agit d'un modèle plus couteux (Baud 2016). L'intérêt du modèle pré-clinique porcin dans l'étude des mécanismes physiopathologiques de la chirurgie métabolique réside dans la proximité de ce grand Mammifère avec l'Homme, qu'elle soit métabolique, anatomique, physiologique. Son régime omnivore, son métabolisme glucido-lipidique et sa propension à l'obésité (à la différence des Rongeurs) associés à l'acceptabilité du grand-public (espèce destinée à la consommation humaine) en font un modèle d'intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes de la chirurgie métabolique (Verhaeghe 2014).

Enfin, les méthodes de chirurgie bariatrique humaine ont été adaptées chez la souris. Ces chirurgies s'accompagnent d'une perte de poids significative et d'une amélioration de la tolérance au glucose. La Sleeve Gastrectomie n'entraine pas de complications chirurgicales. En revanche, le bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y et la diversion bilio-pancréatique s'accompagnent d'une mortalité à 2 mois proche de 100% en raison d'obstructions (sténose des anastomoses) ou de malnutrition (Yin 2011). Une équipe a publié en 2013, une étude sur la faisabilité du bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y Gastric bypass mais cette étude ne comportait que 5 animaux (Hao 2013). Ils ne rapportent pas leur taux de mortalité péri-opératoire. Cette même équipe a publié cette année l'étude phénotypique mais cette fois ci sur 24 animaux (Hao 2016). Une modification de la technique humaine du bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y a été développée chez la souris du fait des difficultés rencontrées lors des tentatives avec la procédure classique. En effet, la partie haute de l'estomac de la souris ne possède pas de puissance contractile suffisante pour

assurer le passage des aliments de la poche stomacale vers le segment intestinal anastomosé, conduisant à terme à une obstruction digestive et à une forte mortalité post-chirurgicale. Le bypass gastrique selon la technique du Roux-en-Y modifié consiste à relier directement l'intestin à la partie basse de l'œsophage, ou à réaliser une anastomose en oméga sur l'estomac laissé en place, après ligature du pylore (Troy 2008), ou encore de réaliser une anastomose en Y après ligature du duodénum (Ayer 2016 in press). Ces modifications permettent d'accroitre la faisabilité et la reproductibilité du bypass chez la souris.

Devant l'intérêt croissant pour le rôle des acides biliaires, des modèles de dérivation biliaire chez la souris ont été mis en place avec des résultats très intéressants, notamment sur l'amélioration des paramètres glucidiques et lipidiques, qui seront détaillés dans les chapitres suivants (Flynn 2015).

2.3. Conséquences de la chirurgie bariatrique

Plusieurs études ont démontré que la prise en charge chirurgicale de l'obésité était supérieure au traitement médical en termes de perte de poids, d'amélioration des comorbidités et de la qualité de vie (Sjostrom 2004, Buchwald 2004). La perte pondérale obtenue après chirurgie est accompagnée d'une amélioration significative des co-morbidités, notamment du diabète de type 2 et du syndrome métabolique. Face à ce constat, un engouement croissant pour la chirurgie bariatrique est né aussi bien chez les médecins que chez les chirurgiens. Le nombre des procédures bariatriques a augmenté de façon exponentielle depuis le début des années 2000, grâce notamment au développement de la laparoscopie. Elles ont également démontré un effet en terme de réduction significative des complications métaboliques liées à l'obésité telles que le DT2 (Buchwald 2009), l'HTA (Courcoulas 2013), ou la stéato-hépatite non alcoolique

(Chavez-Tapia 2010), ainsi que de la mortalité CV (Sjöström 2012), ouvrant ainsi les portes au concept de « chirurgie métabolique » (Buchwald 2009 ; Lee 2015). Même si cet aspect a été moins étudié, il existe une amélioration significative des paramètres lipidiques après chirurgie bariatrique (Puzziferri 2014). Dans ce chapitre, nous allons donc développer les conséquences et les données actuelles de recherche sur l'amélioration des comorbidités suite à la chirurgie bariatrique.

	LAGB		RYGBP		BPD-DS		LSG	
	1 year	Long term	1 year	Long term	1 year	Long term	1 year	Long term
% EWL	48	42.1	75	69	55	80	57.7%	66%
Hypertension	55%	56%	46%	81%	52.9%	40%	62.5%	85.7%
T2DM	58%	50%	72%	82%	74%	90%	76.9%	83%
Dyslipidemia	42%	40%	65%	40%	64.9%	44%	34%	80%
OSAS	45%	46%	75%	60%	44%	52%	56.2%	66%

Tableau 1 : Amélioration des comorbidités après chirurgie bariatrique (Rizello 2012).

2.3.1. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur le diabète

La chirurgie de l'obésité a permis une prise en charge novatrice du diabète de type 2 chez les patients initialement opérés pour obésité sévère, avec dans plus de 80% des cas une disparition du diabète dans les jours suivant l'intervention, avant même une quelconque perte de poids (Coucourlas 2014, Schauer 2014). Cette chirurgie, véritable espoir pour de nombreux patients qui n'amélioraient pas leur diabète malgré des mesures adaptées, n'en demeure pas moins fruste en termes de connaissance des mécanismes à l'heure actuelle (Holman 2008). Le rôle de certaines hormones (incrétines) est souvent évoqué mais reste controversé.

Plusieurs méta-analyses et études randomisées comparant les différentes techniques chirurgicales montrent une amélioration, voir une rémission et une guérison dans certains cas, après chirurgie. Cet effet sur le diabète est durable dans le temps. Mingrone et al montrent que la chirurgie bariatrique (duodénal switch et gastric bypass) permet une rémission de 50% des cas à 5 ans versus 0% dans le traitement médical (Mingrone 2015). Même si la rémission n'est pas maintenue dans le temps, l'interruption de l'insuline permet une amélioration de la qualité de vie des patients. Nous savons que l'effet est plus important dans les techniques malabsorptives (RYGBP, switch duodénal,..) versus les techniques restrictives (anneau gastrique et sleeve gastrectomie) (Müller-Stich 2015). De plus, les études ont confirmé que l'effet antidiabétique était indépendant de la perte de poids pour le by-pass. Une étude comparant l'effet d'une restriction calorique à un by-pass gastrique Roux-en-Y a montré qu'après une perte de poids équivalente, les patients opérés présentaient une meilleure tolérance au glucose que les patients ayant suivi le régime (Laferrère 2008).

Jusqu'à maintenant, les hypothèses proposées, concernant l'amélioration du diabète sont :

1) La restriction calorique sévère.
2) L'arrivée accélérée des aliments ingérés à la partie distale de l'intestin grêle, stimulant la sécrétion de GIP, GLP-1 et PYY et améliorant ainsi l'homéostasie du glucose (hypothèse « hindgut ») (Rubino 2014, Ramracheya 2016), ainsi que la néoglucogénèse intestinale (Troy 2008). Le GLP-1, est une hormone produite par les cellules entéro-endocrines à partir de la maturation post-traductionnelle par clivage enzymatique du proglucagon. Aussi, les premières améliorations de la sensibilité périphérique à l'insuline combinées à une augmentation de la sécrétion d'insuline postprandiale contribuent à l'amélioration du contrôle glycémique après RYGBP (Rhee 2015).
3) Une physiologie digestive altérée en excluant les aliments ingérés du duodénum et du jéjunum proximal (hypothèse « foregut ») (Rubino 2006).

4) La réduction de la sécrétion de ghréline (Rhee 2015).

Toutefois, la résolution à très court terme n'est pas toujours transposée à une résolution à moyen et long terme, soulignant l'importance des mécanismes dépendants de la perte de poids. Quant aux mécanismes dépendants de la perte de poids, ils ne sont pas associés linéairement avec la quantité de poids perdu et sont principalement expliqués par la réduction du contenu en lipides du foie, une amélioration du métabolisme hépatique du glucose ainsi qu'une amélioration subséquente de la sensibilité à l'insuline en périphérie (Poirier 2014). Après chirurgie bariatrique, la fonte de la masse grasse en parallèle avec la fonte de la masse maigre est corrélée à une baisse de la dépense énergétique totale. La fonte prédominante de la masse grasse viscérale pourrait contribuer à améliorer la résistance à l'insuline. En effet, après chirurgie bariatrique, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'amélioration de l'inflammation chronique de bas grade en rapport avec une modulation de la sécrétion des adipokines par le tissu adipeux viscéral (Appachi 2013).

À ce jour, plusieurs facteurs ont été proposés comme étant non favorables à la résolution du diabète de type 2. Ceux les plus couramment proposés sont :

1) Une durée de diabète supérieure à 10 ans.
2) Une insulino-dépendance (Hall 2010, Dixon 2013).

Les autres hypothèses actuelles en cours de recherche sont :

1) La régénération des cellules β pancréatiques (Rumila 2009, Li 2010, Grong 2016). Ce qui pourrait expliquer les cas de nésioblastoses post gastric bypass (Rumila 2009).

2) Le rôle des acides biliaires et notamment le rôle de FXR (Goncalves 2015, Ryan 2014). Cette partie sera développée ultérieurement (Chapitre 5).

3) Le rôle du microbiote intestinal favorisant la néoglucogénèse (De Vadder 2016).

4) Le rôle du transport NA+/glucose au niveau intestinal (Baud 2016).

Ces résultats, malgré leurs mécanismes non encore élucidés à ce jour, ont permis de changer les guidelines de la prise en charge du diabète de type 2 en 2016, en proposant la chirurgie chez les patients obèses diabétiques non équilibrés avec un IMC > 30 kg/m^2 (Rubino 2016).

2.3.2. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur les dyslipidémies

En France, 15,9% de la population générale est traitée pour une dyslipidémie (Obepi 2012). En comparaison à des sujets normaux, les personnes en surpoids sont 2,2 fois plus traitées pour une dyslipidémie, et 2,7 fois plus en cas d'obésité (Obepi 2012). L'amélioration du profil lipidique est souvent évoquée dans les études portant sur la chirurgie bariatrique, mais peu d'entre elles sont exclusivement centrées sur le métabolisme lipidique.

En 2000 Brolin et al. suggéraient que la chirurgie bariatrique pouvait améliorer de façon permanente un profil lipidique anormal en préopératoire, chez les obèses morbides (Brolin 2000). Ces données ont été confirmées par la méta-analyse de Buchwald et al. en 2004 qui concluaient que la dyslipidémie était améliorée dans 70% des cas (Buchwald 2004). De manière très interéssante, en analyse en sous-groupe des triglycérides, HDLc (high density lipoprotein) et LDL (low density lipoprotein); on constate que les résultats sur la baisse de ces lipoprotéines différaient selon le type de chirurgie bariatrique (Buchwald 2004). Les données sont résumées dans la figure 7. En effet, si les différentes techniques ont des résultats comparables en termes de réduction de la triglycéridémie, il existe en revanche une diminution plus marquée du Low-Density-Lipoprotein cholesterol (LDLc) après chirurgie malabsorptive. Mais cette baisse est différente en fonction des techniques chirurgicales (Buchwald 2004). En effet, lorsque l'on regarde les méta analyses, comparant les différentes techniques, nous pouvons observer que la baisse du LDLc est plus importante dans les techniques RYGBP,

switch duodénal et minibypass versus sleeve gastrectomie et anneau gastrique (Buchwald 2004, Nguyen 2006, Sjoström 2012).

L'amélioration du profil lipidique après RYGBP a depuis été confirmée par de nouvelles études (Nguyen 2006 ; Ties 2014 ; Puzziefferi 2014 ; Carswell 2016 ; Cunha 2016). Une étude récente retrouve ainsi une rémission de la dyslipidémie dans 93,3% des cas à 10 ans après BD (Bolckmans 2016). Mais les mécanismes expliquant les modifications du profil lipidique, ne sont jamais étudiés dans ces études. En 2010, Pihlajamäki et al. ont retrouvé une diminution de l'absorption du cholestérol après RYGBP chez l'homme ((Pihlajamäki 2010).

Aztalos et al. ont quant à eux montré une augmentation du HDL-cholestérol en lien avec la perte de poids et la diminution du tour de taille, ainsi qu'une diminution des triglycérides en lien avec la diminution du tour de taille (Asztalos 2010). Ces résultats sont confirmés par Zvintzou et al., qui retrouvent une amélioration de structure et de fonctionnalité du HDL-cholestérol après chirurgie bariatrique malabsorptive chez l'homme (Zvintzou 2014). Griffo et al. ont retrouvé également une augmentation du HDL-cholestérol à jeun et en postprandial après SG ou RYGBP chez l'homme, associée à une diminution des triglycérides (Griffo 2016). Ils ne retrouvent de diminution des LDL, à jeun et en postprandial, qu'après RYGBP (Griffo 2016).

Tous ces résultats sont corrélés à la diminution de la morbi-mortalité cardiovasculaire après chirurgie bariatrique (Bays 2016). Malheureusement les études s'intéressant à la mécanistique modifiant le métabolisme lipidique dans la chirurgie bariatrique/métabolique sont peu nombreuses. Les hypothèses avancées pour cette amélioration de profil après chirurgie bariatrique sont la diminution d'absorption du cholestérol intestinal, le changement du profil des acides biliaires et le changement des consommations alimentaires.

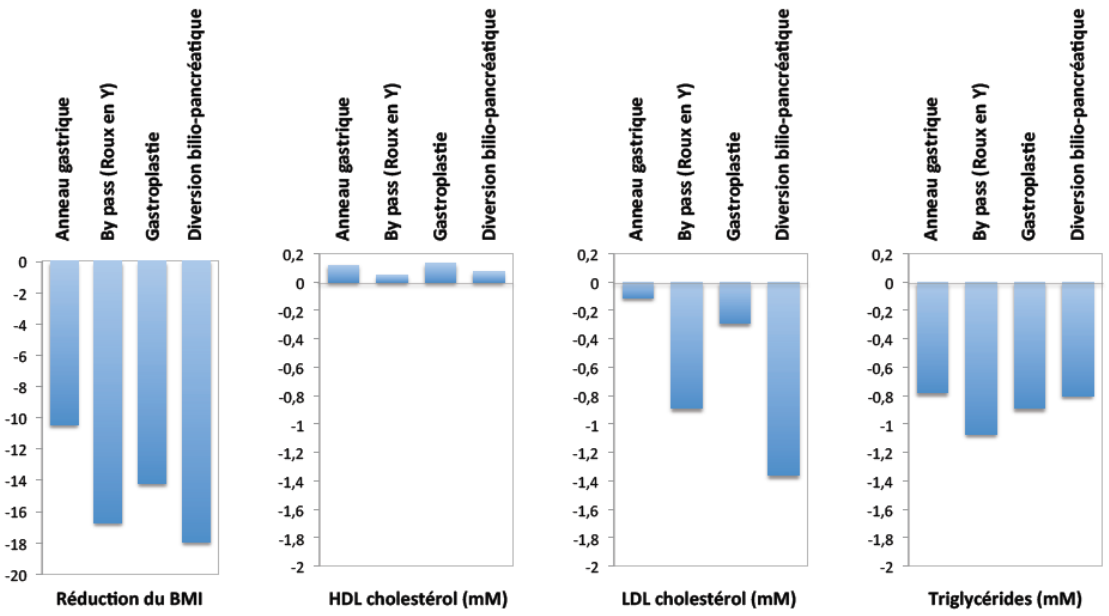


Figure 7 : Impact de la chirurgie bariatrique sur la dyslipdémie (adapté de Buchwald 2004)

L'objectif ce de travail de thèse est donc de comprendre les conséquences de la gastrectomie de type sleeve, du bypass Roux-en-Y modifié et de la dérivation biliaire sur le métabolisme du cholestérol dans un modèle murin, afin de permettre par la suite en fonction des résultats obtenus, d'utiliser des modèles de souris génétiquement modifiées. Nous avons déterminé les conséquences sur le métabolisme du cholestérol de ces chirurgies en mesurant les niveaux plasmatiques de cholestérol et les effets sur l'absorption intestinale de cholestérol, le cycle entérohépatique des acides biliaires et l'excrétion trans-intestinale de cholestérol. Nos résultats permettront de déterminer l'impact des chirurgies bariatriques sur les voies intestinales impliquées dans la régulation du métabolisme de cholestérol et de mieux comprendre les effets hypolipémiants observés après chirurgie.

2.3.3. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur l'hypertension, le risque cardiovasculaire et la mortalité

L'hypertension artérielle (HTA), est beaucoup moins étudiée quand à ces mécanismes de résolution. La résolution de l'HTA semble plutôt survenir à moyen et long terme et/ou lorsqu'il y a une perte de poids significative. Les évidences actuelles montrent que la chirurgie bariatrique mixte est associée à de meilleurs résultats comparativement à la chirurgie bariatrique restrictive (Schiavon 2016). À ce jour, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans la résolution de l'HTA. Il est suggéré que les mécanismes soient dépendants de la perte de poids, mais non linéairement associés. Les hypothèses proposées sont nombreuses, mais la majorité n'a pas été démontrée dans un contexte postopératoire de chirurgie bariatrique.

Elles incluent :

1) Les changements hémodynamiques secondaires à la perte de poids.
2) La modification du profil inflammatoire et du stress oxydatif.
3) Les changements de concentration d'adipokines impliquées dans la régulation de la pression artérielle et/ou de la résistance vasculaire.
4) L'activité du système nerveux sympathique.
5) La régulation des baroréflexes.
6) L'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone. (Adams 2013).

À ce jour, malgré qu'il y ait peu d'évidences dans la littérature, deux facteurs sont proposés comme étant non favorables à la résolution de l'hypertension artérielle soit :

1) L'âge avancé.

2) La sévérité de l'hypertension artérielle, caractérisée par le nombre d'agents pharmacologiques utilisé.

	Type of study	Type of surgery	Resolution	Improvement
Buchwald, 2004 [13]	Systematic review	RYGB, BPD and AGB	61.7 %	78.5 %
Wilhelm, 2014 [14▪▪]	Systematic review	RYGB, BPD, SG, VGB and AGB	50 %	63.7 %
Li, 2015 [15]	Systematic review	RYGB SG	60 % 51 %	Not evaluated
Adams, 2012 [16]	Matched cohort	RYGB	42 %	Not evaluated
Cohen, 2012 [17]	Prospective cohort	RYGB	58 %	Not evaluated
Courcoulas, 2013 [18▪]	Observational cohort	RYGB AGB	38.2 % 17.4 %	Not evaluated
Marceau, 2015 [19▪]	Prospective cohort	BPD	64 %	31 %
Pinheiro, 2008 [20]	Randomized trial	RYGB	55 %	Not evaluated
Schauer, 2012 [27] STAMPEDE	Randomized control trial	RYGB SG	59 % 60 %	Not evaluated

Tableau 2 : Résolution et amélioration de l'hypertension après chirurgie bariatrique (Schiavon 2016)

Concernant la diminution du risque cardiovasculaire et par extension de la mortalité, Sjoström et al ont montré en 2012, que la chirurgie bariatrique était associée à une diminution significative de décès de cause cardiovasculaire et à un moindre risque d'accident cardiovasculaire comparé au traitement médical de l'obésité (Sjoström 2012). Dans cette étude de cohorte prospective comparant la survenue d'évènements cardiovasculaires dans un groupe de 2010 obèses opérés et appariés à un groupe de 2037 obèses traités médicalement, les auteurs ont mis en évidence que l'amélioration du risque cardio-vasculaire au-delà de 10 ans nécessitait une perte de poids conséquente (10 à 40 kg) ne pouvant pas être obtenue par les règles hygiéno-diététiques seules. Cependant, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence d'association significative entre la perte de poids et les évènements cardio-vasculaires, suggérant ainsi des effets de la chirurgie bariatrique indépendants de la perte de poids. Une étude récente a mis en évidence chez 37 patients opérés d'un RYGBP, une amélioration de leur fonction cardiaque, notamment de leur fonction ventriculaire gauche (Shin 2016). Dans cette étude, cette

amélioration était corrélée à la perte de poids (r=0.53, p<0.001) et à la graisse viscérale. Enfin, une méta-analyse récente, met en évidence que la chirurgie bariatrique, grâce à l'amélioration des comorbidités, la perte de poids, la diminution du risque de cancer lié à l'obésité, la diminution du risque cardiovasulaire améliore la mortalité (Zhou 2016). Ces améliorations sont plus importantes après RYGBP (Sundborn 2016).

2.3.4. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur les pathologies digestives

L'association obésité, DT2 et stéatose hépatique est connue depuis longtemps, via le constat d'une forte prévalence de la cirrhose chez les diabétiques. Le terme de «Non-Alcoholic Fatty Liver Disease» désigne les foies de surcharge associés au syndrome métabolique, chez des patients en surpoids avec une répartition androïde des graisses. Ce terme regroupe différents stades de dégénérescence graisseuse du foie, allant de la simple stéatose, à la stéatose avec fibrose portale et périsinusoïdale centrolobulaire, et à la NASH (Non-Alcoholic Steato-Hepatitis). La NASH associe stéatose, inflammation lobulaire et ballonnisation hépatocytaire pouvant progresser dans près de 20% des cas vers une cirrhose avec risque augmenté de carcinome hépato-cellulaire (Farell 2012). L'équipe Lilloise, a montré dans sa cohorte qu'après chirurgie bariatrique, et notamment après RYGBP vs anneau gastrique, il y avait une amélioration de la NASH voir une guérison (85% à un an) avec un maintien de cette guérison à 5 ans. (Caiazzo 2014, Lassailly 2015).

Concernant l'amélioration ou non des fonctions digestives (motricité, perméabilité, inflammation), ces données seront développées ultérieurement dans le chapitre 3.6. La littérature est relativement peu fournie sur ce sujet, préférant habituellement se focaliser sur la

perte de poids et les complications post-opératoires. Quelques publications ont évalué l'importance des symptômes digestifs pré-opératoires. L'importance des effets secondaires "fonctionnels" ne peut en effet être réellement appréciée qu'en comparant les situations pré- et post-opératoires. Nous savons qu'après chirurgie digestive, les patients peuvent présenter les symptômes suivants : halitose, régurgitations ou vomissements, ballonements, pullution microbienne, flatulence, trouble du transit, incontinence, impériosités, … (Patrone 2016).

2.3.5. Conséquences de la chirurgie bariatrique sur les autres pathologies

Outre l'amélioration du diabète, des dyslipidémies, du risque de cancer, du risque cardiovasculaire et de l'HTA, la chirurgie bariatrique engendre de nombreuses modifications comportementales, psychologiques, et a un impact bénéfique sur d'autres comorbidités (SAHOS, rénale, ostéoarticulaires).

Pour exemple, la sévérité de l'Index Apnée Hypopnée (IAH) est directement corrélée aux modifications de poids. Lorsque la perte de poids est obtenue par chirurgie bariatrique, une baisse de l'IAH est également observée. Une large méta-analyse publiée en 2004, portant sur des patients obèses opérés, suggère une rémission du SAS dans 80 % des cas (Buchwald 2004). Mais malgré la réduction significative de l'IAH grâce à la perte de poids, il arrive dans un nombre non négligeable de cas que l'IAH reste supérieur à 15 événements/h : dans une méta-analyse récente portant sur 359 sujets, la chirurgie de l'obésité permettait une réduction de l'IAH de 34 événements/h en rapport avec une baisse de l'IMC de 16 kg/m^2 mais sans rémission complète du SAS dans la plupart des cas (Ashrafian 2012). Une perte de poids,

obtenue médicalement ou chirurgicalement, permet donc de réduire significativement la sévérité de l'IAH, sans toutefois permettre une guérison systématique du SAS.

La chirurgie bariatrique permet donc d'améliorer les comorbidités associées à l'obésité. De nombreuses études sont en cours pour comprendre par quels mécanismes celles-ci sont améliorées, afin de pourvoir dans le futur proposé des solutions médicamenteuses et non chirurgical, ce qui reste un non sens clinique. Dans la suite de mon introduction, nous allons nous focaliser sur les thêmes traités pendant mes 3 années de thèse de science. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux fonctions digestives, leurs rôles, leurs implications et leurs modifications après chirurgie bariatrique.

3. Chapitre 3 : Les fonctions digestives

3.1. L'estomac

3.1.1. Anatomie

L'estomac se compose en différentes régions : le cardia, le fundus, le corps, l'antre et le sphincter pylorique débouchant dans le duodénum. L'estomac proximal, constitué du cardia, du fundus et du corps, assure la fonction de réservoir pour les aliments ingérés. L'estomac distal (l'antre) est le site principal du brassage gastrique et il intervient dans la vidange du bol alimentaire dans l'intestin. La paroi de l'estomac se distingue de l'intestin grêle par ses différences histologiques de la muqueuse et musculeuse gastrique.

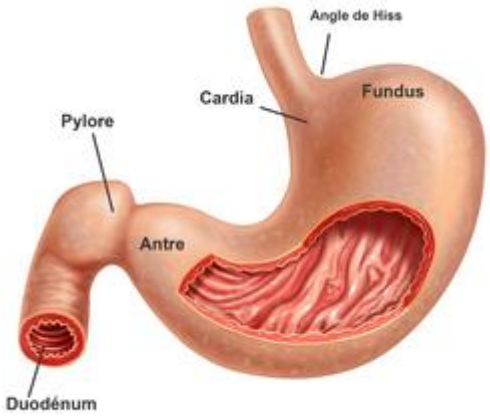


Figure 8 : Anatomie estomac

3.1.2. Histologie

La muqueuse gastrique forme de nombreux replis longitudinaux permettant une distension pendant les repas. Elle est composée d'un épithélium unistratifié constitué de cellules mucipares produisant le mucus. Ce mucus permet de se protéger contre l'acidité

gastrique. En surface, l'épithélium dessine des cryptes en s'invaginant dans la lamina propria. Les cryptes débouchent sur les glandes fundiques, où se divisent 2 types cellulaires : les cellules pariétales qui sécrètent l'acide chlorhydrique et le facteur intrinsèque, et les cellules principales qui secrètent le pepsinogène. Des cellules endocrines sont aussi présentes : au niveau de l'antre, elles libèrent la gastrine, l'histamine, la cholecystokinine, la sérotonine et la somastostatine (Chapitre 3.2.3). La zone antro-pylorique est la zone où la gastrine est la plus présente.

La musculaire gastrique comprend trois couches de muscles : une couche externe longitudinale, une couche moyenne circulaire et une couche interne de fibres obliques. Le pylore présente une individualité anatomique. Ces 3 élements et leurs dispositions permettent à l'estomac d'assurer son rôle de brassage.

3.2.L'intestin grêle

3.2.1. Anatomie

L'intestin grêle mesure environ 5 mètres de long chez l'homme et comprend 3 parties : le duodénum (25 centimètres), le jéjunum (environ 2 mètres) et l'iléon (2-3 mètres). Le maintien en place est permis par la présence du mésentère et du péritoine. L'intestin grêle est vascularisé par l'artère mésentérique supérieure, issue de l'aorte abdominale et par la veine porte, qui se jette par la suite dans le foie. Les canaux lymphatiques viennent se jeter dans le canal thoracique qui débute dans l'abdomen puis traverse le thorax et viennent se jeter dans la veine sous-clavière gauche.

3.2.2. Histologie

Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse intestinale offre une surface d'échange très importante entre le milieu intérieur et la lumière intestinale grâce à 3 niveaux d'organisation.

1/ Les replis profonds présents tout le long de la muqueuse, appelés valvules conniventes. Ils augmentent 3 à10 la surface d'échange au niveau de la muqueuse, particulièrement au niveau du duodénum et jéjunum.

2/ La présence des villosités intestinales qui multiplient par 20 la surface d'échange

3/ Enfin les microvillosités sont des replis formés par la membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales (CEI) bordant la lumière intestinale. Des artérioles, des réseaux de capillaires sanguins et des veinules se situent au centre des villosités intestinales. Ils récupèrent les nutriments hydrosolubles issus de l'absorption intestinale et les emmènent vers le foie via la veine porte hépatique. Les capillaires lymphatiques ou chylifères présents à l'extrémité de la villosité, prennent en charge les lipides et les vitamines liposolubles.

La muqueuse intestinale est constituée de la muscularis mucosae, de la lamina propia et de l'épithélium intestinal que l'on nommera la barrière épithéliale intestinale.

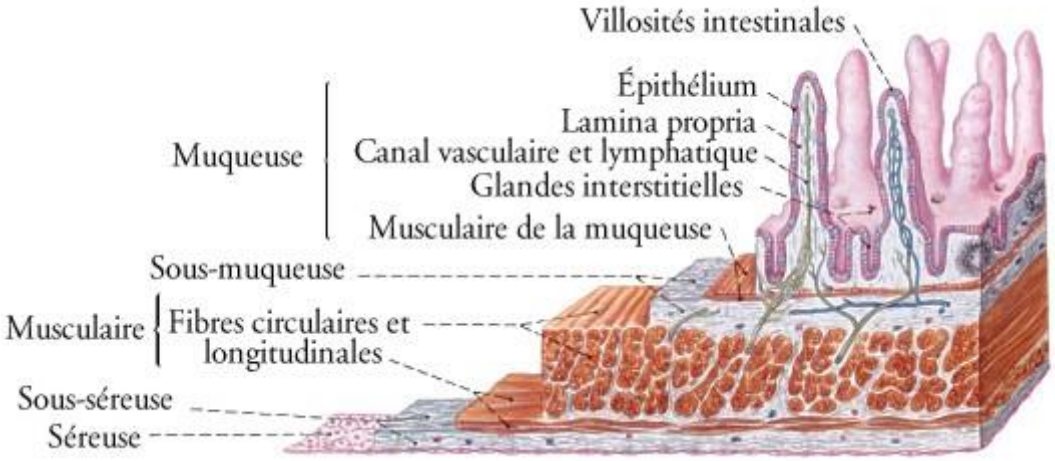


Figure 9 : Histologie de l'intestin grêle (http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tube-digestif)

3.2.3. Rôle des peptides gastrointestinaux

Les incrétines, GLP1 (Glucagon-like peptide-1) et GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) sont des hormones gastro-intestinales qui sont sécrétées lors de la prise alimentaire suite à l'augmentation de la glycémie par les cellules K (présentes au sein du duodénum et du jéjunum proximal) pour le GIP et L (présentent au niveau de l'iléon et le colon) pour le GLP1. En agissant directement sur la cellule β du pancréas, ces hormones vont potentialiser l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline postprandiale. McIntyre et al. ont montré que l'administration d'un bolus de glucose par voie orale induit une plus forte sécrétion d'insuline que l'administration du même bolus par voie intraveineuse (McIntyre 2008). On parle alors d'effet incrétine. Il a été estimé que le GLP1 et le GIP sont responsables d'environ de 50% de l'amplitude de l'insulinosécrétion (Kim 2008).

Il existe d'autres peptides gastro intestinaux avec un rôle important dans la prise alimentaire, la digestion et l'absorption des nutriments. Les principaux peptides et leurs effets majeurs sont listés ci-dessous :

- la gastrine (cellules G estomac et duodénum). Sa sécrétion est déclenchée à la vue ou au contact des aliments après distension de l'estomac qui stimule la voie nerveuse intrinsèque, le nerf vague (Delvalle 1990).

- la cholécystokinine (cellules I du duodénum et du jéjunum), est une hormone anorexigène en réponse à l'arrivée d'AG et d'acides aminés dans l'intestin grêle. Son rôle principal connu est la stimulation de la contraction de la vésicule biliaire mais la CCK stimule aussi la motilité gastrique et intestinale et relâche le sphincter du bas-œsophage et le sphincter d'Oddi (Giannoulis 1982). Elle possède une action trophique et est considérée comme un régulateur physiologique de la croissance du pancréas. Une étude récente a mis en évidence chez 10 sujets sains le rôle de la cholécystokinine dans l'augmentation de la sécrétion du GLP1 (Rohde 2016).

- la secrétine (cellules S duodénum et jéjunum) est secrétée en réponse à l'arrivée du chyme acide de l'estomac. Elle est également induite par la cholécystokinine et la stimulation du nerf vague.

- le somastostatine (cellules D du fundus, intestin grêle et pancréas) est induite en réponse à un Ph acide. Elle exerce un rôle inhibiteur sur les autres peptides gastro-intestinaux (Ergerod 2015).

- le PYY (iléon et colon) produit en réponse aux lipides et à effet anorexigène. Sa sécrétion peut être stimulée par des signaux neuro-hormonaux originaires de l'intestin grêle, comme la cholécystokinine (Batterham 2002).

- la leptine gastrique (cellules endocrines du fundus) est secrétée par des facteurs nerveux et hormonaux activés par l'ingestion du repas (Bado 1998). Elle a un rôle satiétogène et est impliquée dans le contrôle de l'absorption des protéines (Guilmeau 2003).

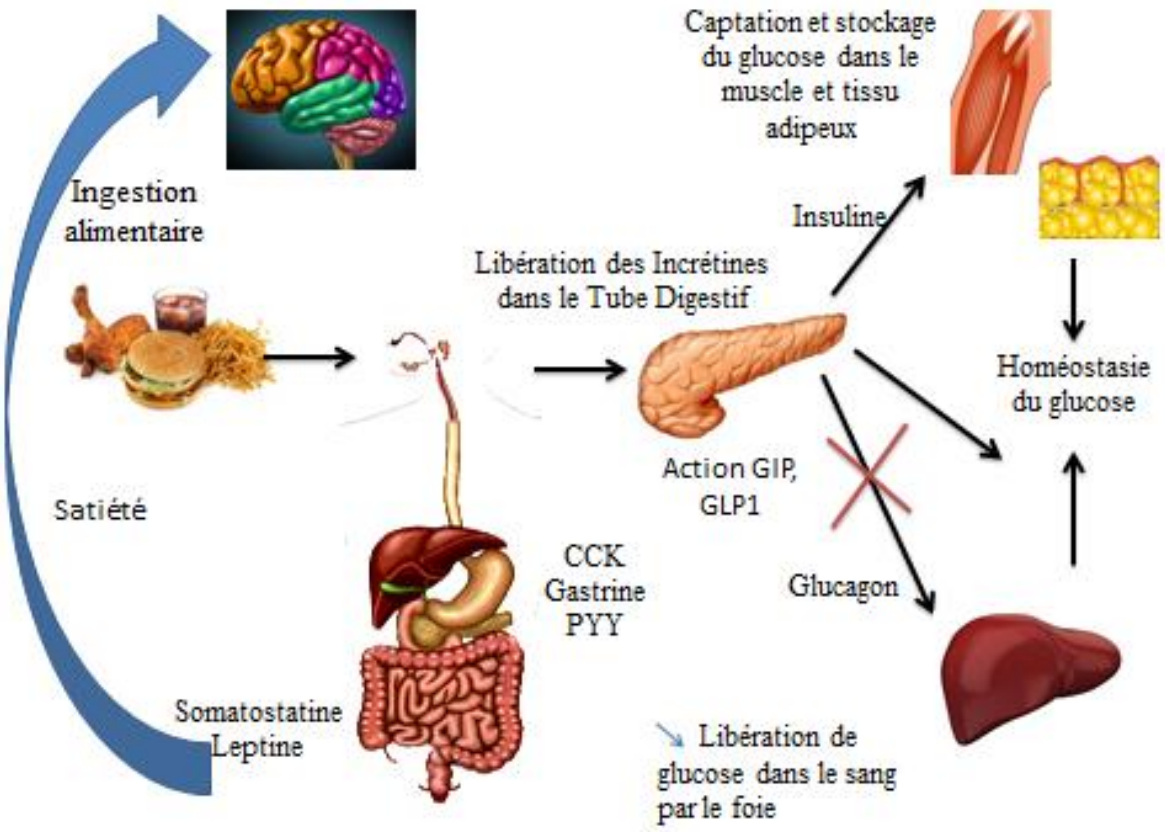


Figure 10 : Rôle schématique des peptides gastro-intestinaux

3.3. La motricité digestive

La motricité gastro intestinale participe à la fois à la fragmentation des aliments, c'est-à-dire à la séparation de leurs différentes molécules constitutives, et au transport du bol alimentaire tout au long du tube digestif.

L'estomac, grâce à une compliance élevée et une contraction coordonnée de ses 3 couches musculaires, permet le broyage et le mélange des aliments avec les secrétions gastriques. Ce mélange (chyme) est par la suite évacué vers le duodénum et le jéjunum, grâce à la contraction pylorique. Cette région n'est pas touchée à la suite de la sleeve gastrectomie. Il faut environ 4 heures pour vidanger complètement l'estomac chez l'homme, mais variable en fonction de la composition du repas : plus rapide pour les liquides vs solides, plus rapide pour les glucides, puis les protéines et enfin les lipides (Hunt 1975). Il existe des retrocontrôles négatifs : le reflexe gastroduodénale et le frein iléal (Welch 1988) qui permettent par la suite de réguler l'arrivée de la chyme et notamment des acides gras pour permettre leur émulsification par les sels biliaires.

Dans l'intestin grêle, les mouvements moteurs les plus importants sont la segmentation et le péristaltisme. Ils permettent la progression du chyme vers le colon, qui parcourt toute la longueur de l'intestin grêle en 3 à 5 heures chez l'homme. La segmentation permet le mélange du chyme avec les enzymes digestives présentes dans l'intestin grêle et facilite l'absorption des produits de digestion. Elle consiste en des contractions annulaires, oscillantes du muscle lisse circulaire tout le long de l'intestin grêle (Gwynne 2007). Il existe une alternance de contraction et de relaxation qui permet un malaxage et une fragmentation de l'alimentation. Ce phénomène moteur est commandé par le système nerveux entérique (SNE) mais aussi par l'innervation extrinsèque : sympathique (diminue la segmentation) et parasympathique (augmente la segmentation) (Cannon 1912).

Le péristaltisme, quant à lui, est réalisable grâce aux fibres musculaires circulaires et longitudinales. Il existe une alternance de relaxations-contractions qui pousse le bol alimentaire le long du tube digestif. Ces vagues péristaltiques sont médiées par le SNE et par les nerfs extrinsèques et par diverses hormones gastrointestinales. La stimulation parasympathique

augmente l'excitabilité des muscles lisses à l'inverse de stimulation sympathique. Le temps de transit dans l'intestin grêle chez l'homme est de 2 à 4h.

Dans le colon, les mouvements segmentaires sont, comme dans l'intestin grêle, des contractions annulaires rythmiques qui provoquent le mélange du bol alimentaire avec les enzymes bactériennes et favorisent les échanges hydro-électrolytiques. Ces contractions propulsent le contenu vers le rectum très lentement. Les réflexes gastro-coliques et duodéno-colique permettent de renforcer la contraction colique. L'arrivée des aliments dans l'estomac entraine 10 min après le repas une contraction colique. Ces reflexes sont médiés par l'innervation intrinsèque et extrinsèque. Le temps de transit dans le colon est entre 34 et 54h chez l'homme.

Le temps de transit total varie donc entre les individus et est en moyenne de 70 heures en occident. Mais celui peut être altéré lors de phénomènes inflammatoires, de troubles de la perméabilité et de la barrière intestinale.

3.4. La barrière épithéliale intestinale

3.4.1. Description

La barrière épithéliale intestinale (BEI) est un élément essentiel du tube digestif. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle du passage de nutriments et d'électrolytes. De plus, elle contrôle le passage de pathogènes tout en participant à la tolérance immunitaire. Elle forme l'interface entre l'environnement luminal et les tissus sous-jacents. La BEI est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) en perpétuel renouvellement et maintenues les unes aux autres par des complexes jonctionnels. Il existe quatre types principaux de CEI : les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucosécrétantes ou

caliciformes à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (impliquées dans l'immunité innée). Le maintien de l'homéostasie de la BEI est assuré par un équilibre entre la prolifération et l'exfoliation des CEI (Potten 1997 ; Potten 1998) ainsi que par la capacité réparatrice de la BEI. L'épithélium est remplacé intégralement tous les 4-5 jours chez l'homme et nécessite la production d'environ 10 milliards de cellules nouvelles par jour (Bullen 2006; van der Flier and Clevers 2009). Ce renouvellement résulte d'une régulation coordonnée de la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration le long des cryptes et enfin, la mort cellulaire résultant en une exfoliation de l'épithélium.

La BEI est en permanence soumise à des agressions physiques lors de processus physiologiques, tels que les déformations répétitives de la muqueuse dues au péristaltisme ou encore par le passage du bol alimentaire, pouvant conduire à la formation de lésions de surface générant des défauts de continuité de la BEI (Chaturvedi 2007). Dans des conditions pathologiques comme lors d'invasions par des pathogènes ou lors d'états inflammatoires chroniques, d'importantes lésions de la BEI peuvent se produire et des processus de réparation importants de celle-ci sont alors nécessaires pour assurer un retour à l'homéostasie. Des défauts des processus de réparation peuvent conduire à la formation d'ulcérations de la muqueuse (Sturm and Dignass 2008). Le processus de réparation de la BEI est schématiquement constitué de trois étapes séquentielles qui, en réalité, se superposent chronologiquement *in vivo* (Sturm and Dignass 2008**).** La première étape est appelée la restitution épithéliale (Figure 11). Elle consiste en la migration et l'étalement des cellules viables entourant la zone lésée pour aboutir à un rétablissement rapide de la continuité de la BEI (Lacy 1988). La restitution épithéliale résulte directement de la motilité des CEI et est communément admise comme étant indépendante des mécanismes de prolifération cellulaire. Suite à la restitution épithéliale et si nécessaire, s'en suivront les deux dernières étapes des processus de prolifération et de différenciation des CEI afin d'aboutir à une régénération de la continuité et des fonctions de la BEI (Sturm and Dignass 2008). Pour les cas de lésions sévères et profondes, la réparation de la

paroi intestinale peut prendre plusieurs jours à plusieurs semaines et implique un remodelage de la matrice extracellulaire, de la sous-muqueuse et parfois même des couches inférieures. Ces étapes de réparation et cicatrisation peuvent être altérées, par exemple lors de fibrose où l'on observe un excès de production de collagène et d'éléments de la matrice extracellulaire. Pour des lésions superficielles, la réparation de la BEI est plus rapide, de quelques heures à quelques jours selon la taille de la lésion (Podolsky 1999). Enfin, au sein de la BEI, la CEI est en interaction avec ses cellules voisines et avec la lame basale de la matrice extracellulaire sur laquelle elle repose. Elle réalise donc des interactions de type cellule-cellule et cellule-matrice.

Comme précédemment évoqué, la BEI doit assurer deux fonctions complémentaires : d'une part être perméable pour assurer l'absorption de nutriments et d'électrolytes, et d'autre part, protéger l'organisme de l'incursion d'agents pathogènes. La BEI forme en fait schématiquement 2 types de barrières : une barrière physique ou intrinsèque due à la présence des CEI, responsables de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire, et une barrière extrinsèque formée principalement par les produits sécrétés par les CEI tels que le mucus, les ions chlore ou encore des peptides anti-microbiens tels que les granzymes.

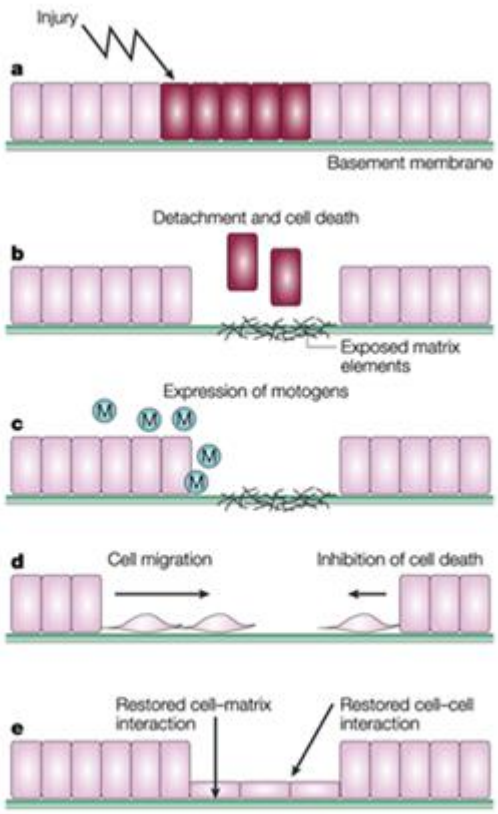


Figure 11 : Concepts fondamentaux de la restitution épithéliale

(Taupin and Podolsky 2003)

1. Une lésion localisée de la BEI reposant sur la matrice extracellulaire
2. Entraine le détachement et la mort des CEI générant ainsi un défaut de continuité de la BEI et une exposition directe de la matrice au contenu luminal.
3. La matrice et les cellules adjacentes à la BEI libèrent des facteurs favorisant la restitution (motogens; M)
4. Qui entrainent l'étalement et la migration des cellules viables entourant la zone lésée et une inhibition de la mort des CEI
5. La restauration de la continuité de la BEI et de ses fonctions est permise par une restauration des jonctions cellule-cellule et cellule –matrice.

3.4.2. Perméabilité paracellulaire et transcellulaire

Les flux d'ions, peptides ou nutriments à travers la BEI peuvent être assurés par deux types de voies : une voie paracellulaire et une voie transcellulaire.

La perméabilité paracellulaire est contrôlée par des complexes moléculaires jonctionnels des CEI et peut aussi jouer un rôle direct de protection contre les pathogènes ou allergènes (Madara 1990). Les interactions cellule-cellule sont réalisées par différents complexes parmi lesquels figurent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Figure 12).

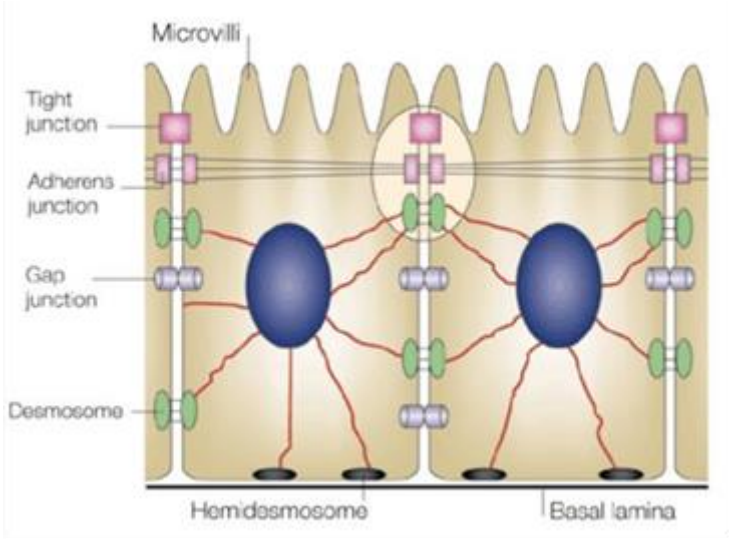


Figure 12 : Organisation du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales (Tsukita 2001)

Les jonctions serrées ou tight junctions sont formées par des complexes multi protéiques associant des protéines transmembranaires et par des protéines cytoplasmiques. Les protéines transmembranaires sont constituées par la famille des claudines qui comprend 24 membres, l'occludine et la protéine JAM (Junction Adhesion Molecule). Les protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine via les protéines Zonula Occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et la cinguline (Forster 2008). La taille des pores est définie par la nature des protéines formant les jonctions serrées, contrôle la perméabilité paracellulaire et permet le passage sélectif entre les cellules épithéliales de molécules en fonction de leur taille et de leur charge (Tsukita 2001). Les jonctions adhérentes ou zonula adherens relient les CEI entre elles via les interactions homophiles Ca^{2+}-dépendantes réalisés par la protéine transmembranaire E-cadhérine (Ebnet

2008 ; Nieset 1997). Il existe encore d'autres jonctions cellule-cellule telles que les desmosomes. Ces complexes protéiques relient les CEI par leur cytosquelette de filaments intermédiaires de cytokératines. Ils permettent à la BEI de résister aux forces de pression et de tiraillement (Garrod 2002). Enfin, les jonctions communicantes ou gap junctions, permettent aux CEI de communiquer entre elles par des signaux chimiques ou électriques (Prochnow 2008).

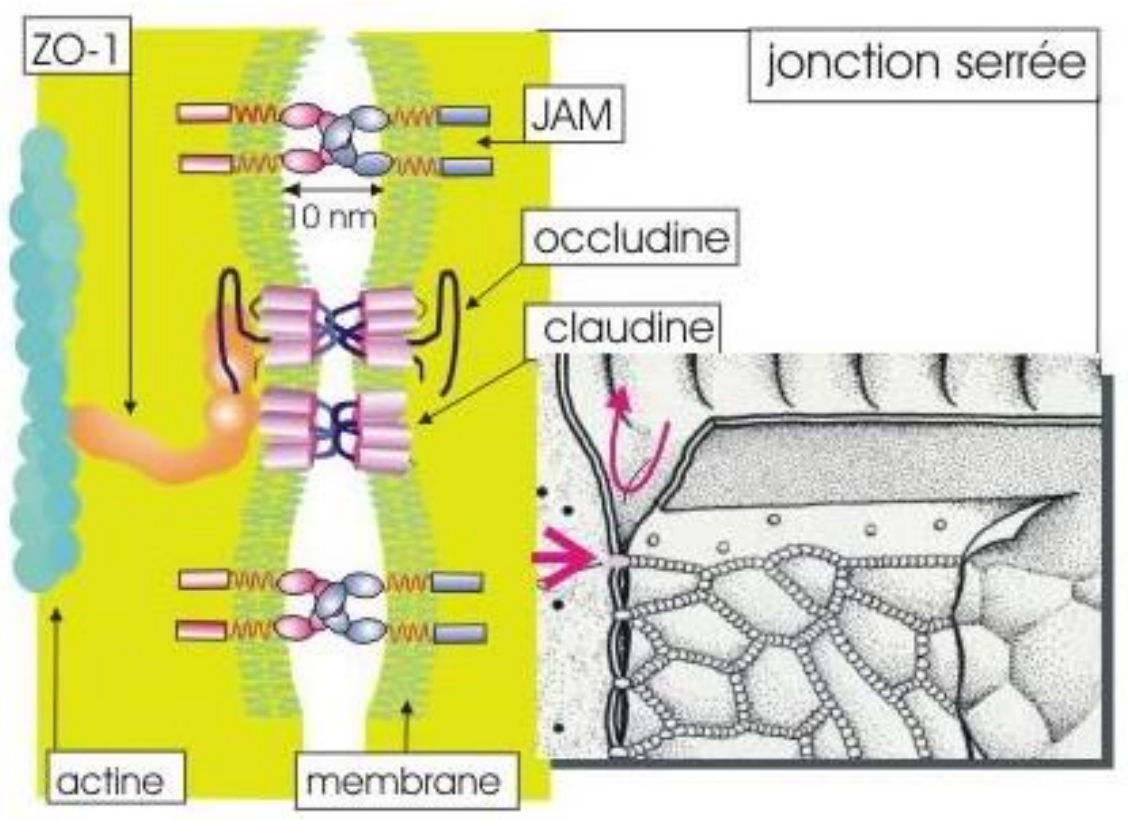


Figure 13 : Schéma simplifié de l'organisation moléculaire des jonctions serrées

(Niessen 2007)

La perméabilité transcellulaire, permettant le passage de molécules de tailles plus grandes et met en jeu divers canaux ou transporteurs (assistés ou non) présent dans la membrane cytoplasmique. Elle permet le passage des nutriments, de l'eau et des électrolytes à travers les entérocytes vers la circulation sanguine. Selon leurs propriétés, les molécules

peuvent traverser l'épithélium de manière passive ou active, par diffusion ou par l'intermédiaire de transporteur spécifiques.

L'absorption active des électrolytes et de l'eau par le CEI s'effectue par plusieurs mécanismes. Au niveau apical, le cotransport NA+/glucose ou Na+/acide aminé, qui entraine une électronégativité luminale et une absorption d'eau, qui concentre les ions dans la lumière intestinale. Il en résulte une absorption d'anions Cl- par des voies para et trans cellulaire. La voie transcellulaire est permise par le cotransporteur Cl-/HCO3- au niveau apical des entérocytes. L'absorption de NaCl résulte en une absorption d'eau qui concentre les ions K+ dans la lumière intestinale et favorise leur passage par voie paracellulaire.

La sécrétion de l'eau et des électrolytes s'effectue au niveau des cryptes. Les ions CL- pénètrent au niveau basolatéral des CEI grâce au cotransporteur NA+/K+/2Cl-. Puis les ions Cl- sont secrétés au niveau apical par des canaux CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). La secrétion de Cl- entraine la secrétion de Na+ par voie paracellulaire et la secrétion d'eau. Les ions K+ sont évacués au pôle basolatéral. Lorsque la cellule est au repos, les canaux Cl- sont au repos.

L'absorption des nutriments notamment les acides gras sont détaillés plus bas (chapitre 4.4.1) Les monosaccharides (glucose, fructose, galactose), même s'ils peuvent diffuser à travers la membrane plasmique, sont majoritairement transportés dans les entérocytes par des transporteurs spécifiques. Le fructose pour sa part est transporté, selon un gradient de concentration par le GLUT5 au niveau apical et par le GLUT2 au niveau basolatéral. Le glucose et le galactose, quant à eux sont absorbés au niveau de l'entérocyte grâce à un transporteur actif Na+ au niveau apical et au niveau baslatéral vers le sang par un transporteur GLUT2. Concernant les acides aminés neutres, un mécanisme similaire du glucose et du galactose, dépendant du sodium existe.

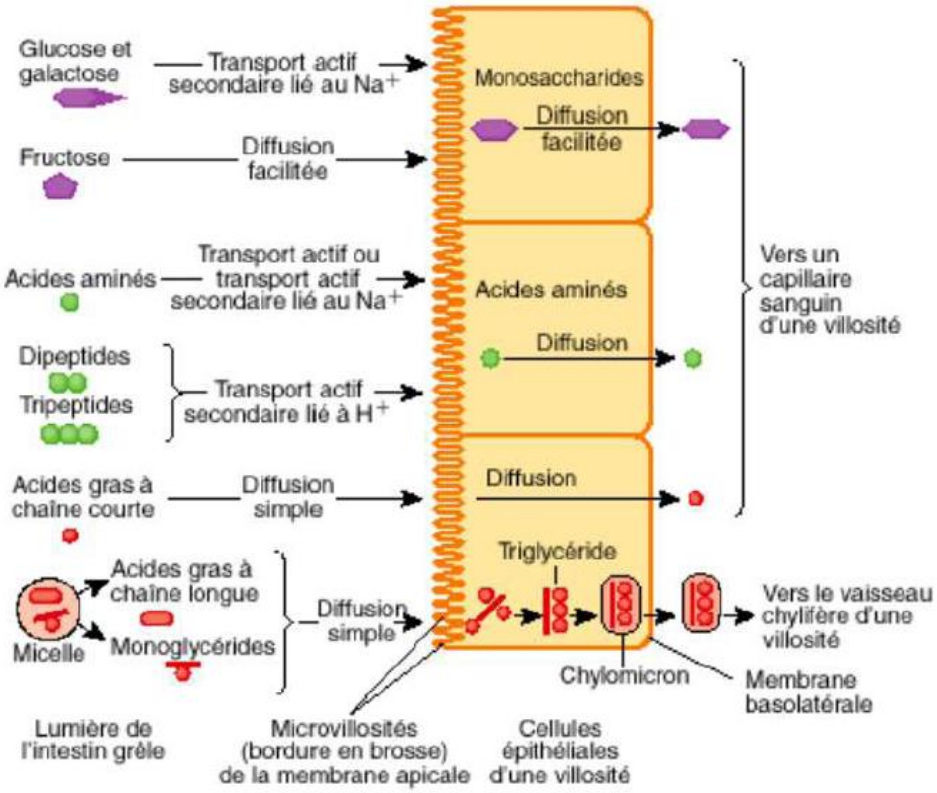


Figure 14 : Mécanismes par lesquels les nutriments traversent la barrière

(http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/Phys_digest_14.pdf)

Enfin l'absorption des macromolécules ne peut être fait par diffusion ou à l'aide de transporteurs, de par leur taille. Leur absorption est permise par des phénomènes d'endocytose, à la fois par phagocytose et pinocytose. La molécule HRP (Horseadish peroxidase, 40kDa) traverse également la BEI par pinocytose (Walker 1972).

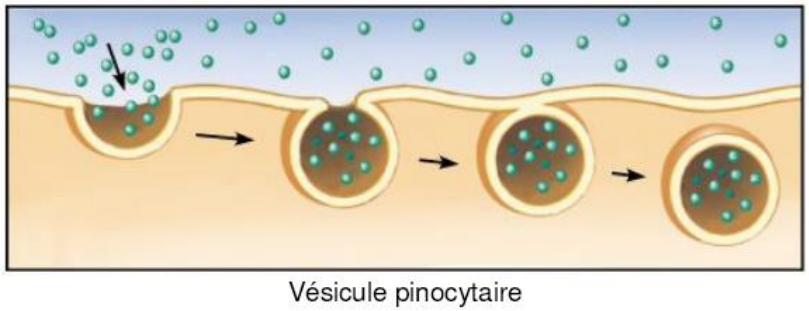


Figure 15 : Mécanisme de pinocytose

(http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/Phys_digest_14.pdf)

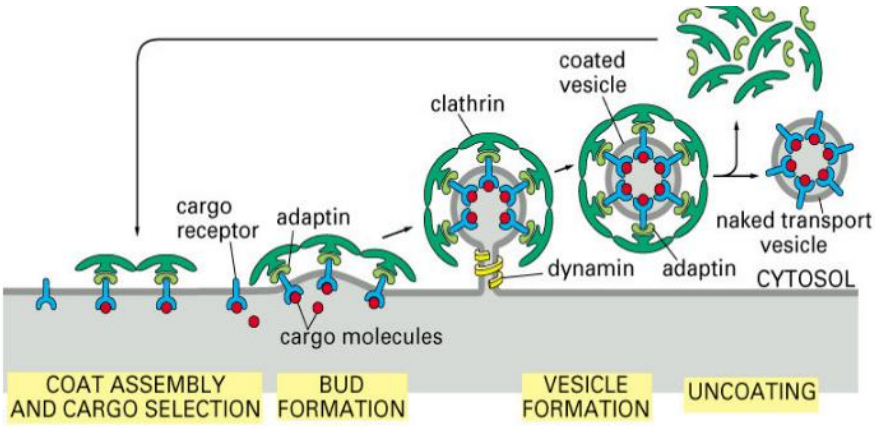


Figure 16 : Mécanisme endocytose

(http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/Phys_digest_14.pdf)

3.4.3. Fonctions extrinsèques

A la surface de la BEI, se trouvent différents constituants, sécrétés par les CEI, dont la présence permet de jouer un rôle de barrière. Ils constituent la partie extrinsèque de la BEI et représentent de par leur position anatomique, le premier mécanisme de défense face à l'agression de pathogènes. Ainsi, l'épaisseur et la composition de la couche de mucus qui tapisse la surface épithéliale constituent une ligne de défense contre l'adhésion et la pénétration des toxines, bactéries et antigènes (Frey 1996). Elle représente une barrière physico-chimique contre la diffusion de micro-organismes. Sa richesse en radicaux sialates et sulfates électronégatifs constitue une barrière anionique à la pénétration des germes. Elle est riche en lyzozyme doué d'une activité anti bactérienne. La sécrétion d'eau et d'électrolytes par les CEI (Corfield 2000) joue également un rôle très actif dans la défense de la muqueuse.

3.5. Effets du régime hyperlipidique sur les fonctions gastro-intestinales

Le régime hyperlipidique est caractérisé par un apport excessif en lipides uniquement. Il contient entre 10% et 40% de lipides en poids et fournissent donc entre 20 et 60% de l'apport énergétique total par les lipides. La plupart des régimes high fat diet sont enrichis en lipides saturés d'origine animale ou végétale (Buettner 2006).

3.5.1. Effets du régime hyperlipidique sur la motricité gastro-intestinale

Avant même de parler du régime hyperlipidique, nous savons que les lipides alimentaires entraîne un ralentissement de la vidange gastrique par relaxation de l'estomac proximal (Feinle 1996), diminution des contractions de l'antre (Heddle 1988) et du duodénum et augmentation des contractions pyloriques (Heddle 1988). Il existe aussi une diminution de la vitesse de transit intestinal chez l'homme (Read 1984) mais aussi le rat (Brown 1990).

A contrario, l'effet sur le long terme et dès 2 à 4 semaines après le début du régime semble induire une modification des mécanismes par lesquels les lipides régulent le transit et résulte à une accélération de la vidange gastrique. En effet différentes études ont montré chez le rat et chez l'homme une augmentation du temps de transit dès 2 semaines chez le rat (Covasa 2000) et chez l'homme (Cunningham 1991) par rapport à un régime standard.

3.5.2. Effets du régime hyperlipidique sur la perméabilité et la BEI

Un régime hyperlipidique entraîne des modifications de la morphologie de la BEI qui sont variables selon la source lipidique. Après un régime High Fat (40%), il existe, chez la souris, une augmentation de la prolifération des CEI dans le jéjunum, avec une augmentation de la taille des villosités et de l'aire d'absorption, par rapport à un régime contrôle (Petit 2007).

Des modifications de la perméabilité intestinale ont été observées chez des animaux nourris avec un régime hyperlipidique. Chez la souris, suite à 4 semaines de régime high fat (53%), il existait une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées (ZO-1 et occludine) et donc une augmentation de la perméabilité (Cani 2008). Ces résultats sont liés à la modification du microbiote, avec une augmentation de l'endotoxémie et une inflammation intestinale (Cani 2008). Une deuxième étude, a mis en évidence après un régime high fat diet (27%) pendant 8-10 semaines, une altération des protéines de jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité paracellulaire, chez le rat. Tout ceci entraine une inflammation digestive (de La Serre 2010). Ces résultats ont été confirmés chez des rats obèses sous régime high fat (Suzuki 2010).

Chez l'homme, les données sur les changements de la perméabilité intestinale dans l'obésité sont rares et discordantes (Genser 2016). Alors qu'en 2010, une étude ne montrait aucune modification de la perméabilité (au niveau du grêle et du côlon) telle que mesurée par l'excrétion urinaire de sucres (Brignardello 2010), en 2012, le même test mettait en évidence une légère augmentation chez les sujets obèses (Teixera 2012). Une troisième étude objectivait une perméabilité gastroduodénale augmentée chez les sujets obèses, sans différence au niveau de l'intestin grêle et du côlon (Verdam 2013). Chez des sujets sains, une corrélation positive est

observée entre la perméabilité au niveau du côlon et la quantité de graisse viscérale, sans qu'il y ait de relation avec l'indice de masse corporelle (Gummesson 2011).

3.5.3. Perméabilité et microbiote

Le microbiote intestinal est composé d'environ un millier d'espèces bactériennes commensales du tube digestif, avec une abondance et probablement une composition qui sont variables le long du tractus digestif. Les écosystèmes bactériens varient également en fonction de leur positionnement, dans la lumière ou dans les couches de mucus, mais les connaissances dans ce domaine restent limitées (Desseyn 2015). Le microbiote contribue à la maturation du système immunitaire intestinal et à la défense de l'hôte contre les agents pathogènes. Il permet également le renforcement de la barrière en induisant la production de mucus, la sécrétion de défensines et d'immunoglobulines A sécrétoires (IgAs) et la synthèse des protéines de jonction serrée par les entérocytes (Cerf-Bensussan 2010). De plus, il favorise la digestion des aliments, notamment la fermentation de polysaccharides alimentaires qui conduisent à la production d'énergie par la fabrication d'acides gras à chaîne courte, principalement l'acétate, le propionate et le butyrate.

Le microbiote a fait l'objet de nombreux travaux dans le contexte de l'obésité et des maladies cardiométaboliques. Ainsi la prise de poids, induite par un régime gras, est moindre chez des souris axéniques (nées et élevées en milieu stérile donc exemptes de bactéries) par rapport à des souris conventionnelles (Ding 2010). La transplantation d'un microbiote fécal chez ces souris induit une augmentation de la masse grasse plus importante lorsque la flore provient d'une souris obèse que lorsqu'elle provient d'une souris mince (Turnbaugh 2006). Chez les souris rendues obèses par un régime hyperlipidique, la dysbiose (déséquilibre du microbiote) observée au cours de l'obésité est associée à une altération de la perméabilité intestinale (Cani 2008, Moreina 2012). La dysbiose est associée à différentes pathologies de

l'hôte l'hébergeant. L'administration d'antibiotiques atténue les effets du régime hyperlipidique sur les paramètres de la perméabilité intestinale (Cani 2008) et plusieurs travaux suggèrent qu'il est possible de modifier ces paramètres par traitement avec des bactéries commensales ou des pré- et probiotiques, suggérant que la composition du microbiote peut moduler l'efficacité de la barrière intestinale (Moreina 2012). Les données obtenues chez l'homme ont montré que la dysbiose est associée à une augmentation des risques cardiométaboliques. Une de ses caractéristiques est la perte de diversité du microbiote que l'on observe chez certaines (20 à 40%) personnes obèses, accompagnée de l'enrichissement ou la perte de certains groupes bactériens (Kelly 2016). La perméabilité intestinale, mesurée *in vivo*, n'est, pour l'heure, pas associée aux changements de composition du microbiote fécal (Verdam 2013). Ceci n'exclut cependant pas le rôle que pourraient jouer certaines bactéries présentes au niveau de segments plus proximaux de l'intestin.

3.5.4. Effets du régime hyperlipidique sur l'inflammation

A la suite d'un régime hyperlipidique, il existe une augmentation de l'absorption du LPS et donc une augmentation du LPS circulant (Saad 2016). En effet, la consommation d'un régime high fat entraîne des modifications du microbiote intestinal (augmentation des bacilles Gram Négatif) qui diminue l'activité de la phosphatase alcaline intestinale, enzyme de la bordure en brosse capable de détoxifier le LPS, et augmente l'activité du TLR-4 (Toll-Like Receptor-4), recepteur au LPS, dans les céllules épithéliales (Medzitov 2009). Il en résulte une inflammation gastro intestinale (TNFα, IL1β, IL6,…) responsable d'une altération de la perméabilité intestinale et une augmentation du passage du LPS à travers la BEI (de La Serre 2010). Ce qui entraîne une diminution de l'expression des jonctions sérrées (occludin, Z01, claudine) qui entraine à son tour une translocation du LPS. Ce mécanisme va induire dans le

temps une réponse inflammatoire et une insulino résistance (Caricilli 2011, Cani 2007, Burcelin 2012).

Un autre mécanisme important de l'inflammation subclinique chez les humains obèses diabétiques et obèses est une augmentation du TNF-α, IL-6 et MCP1, qui active le NF-kB. (Daniele 2014, Hotamisligil 1993). Cette activation de cette voie va léser la BEI en augmentant la perméabilité paracellulaire.

La zonuline est un analogue endogène eucaryote d'une endotoxine produite par la bactérie responsable du choléra. Comme l'endotoxine, elle désorganise les jonctions serrées intercellulaires et altère la perméabilité intestinale (Li 2016). Le taux de zonuline est augmenté dans le sérum de patients ayant une maladie coeliaque en phase active et chez les patients souffrant de diabète de type 1. Une élévation modeste de zonuline circulante (20 %), corrélée à l'IMC et l'insulino-résistance, ainsi qu'aux paramètres de l'inflammation systémique, a été observé chez des sujets en surpoids et obèses. Mais cette augmentation sérique ne reflète pas la concentration locale au niveau de l'intestin (Li 2016). La zonuline est un précurseur de l'haptoglobine 2, un marqueur non spécifique de l'inflammation systémique. Pour le moment aucune étude n'a mis en évidence une modification de la production de cet analogue après la perte de poids et/ou chirurgie bariatrique.

3.6. Effets de la chirurgie bariatrique sur les fonctions gastro-intestinales

La chirurgie bariatrique modifiant l'anatomie et entrainant une perte de poids, il est donc logique de penser que celle-ci entraine une modification à la fois de la motricité, de la perméabilité et de l'inflammation. Dans ce chapitre, les effets de la chirurgie bariatrique sur ces différents aspects vont être détaillés.

La chirurgie bariatrique modifie le transit. Celui-ci peut être accéléré dû à une diminution de l'absorption intestinale mais aussi dû à la modification du microbiote. La diarrhée et la stéatorhée apparaissent comme la complication digestive les plus fréquente 2 ans après un bypass gastrique ou une dérivation bilio-pancréatique (39 % des patients) (Ocon Breton 2005). Alors que pour Ballem sur la base de 1724 questionnaires chez 763 patients consécutifs avec by-pass gastrique, les symptomes digestifs (incluant diarrhées et flatulences) étaient inchangés ou avaient tendance à s'améliorer par rapport au préopératoire (Ballem 2009). Potoczna avait retrouvé quant à lui un impact significatif de cette procédure chirurgicale par rapport à la situation préopératoire et à l'anneau gastrique (Potoczna 2008). Si la majorité des patients signalait un transit normal avant chirurgie, le by-pass gastrique avait pour conséquence une fréquence 7 fois plus élevée de diarrhée ou de selles molles (46 % après by-pass contre 8 % avant) et 9 fois plus de flatulences (49 % après by-pass contre 5,6 % avant). Cependant, la dérivation bilio-pancréatique apparaît dans la majorité des cas significativement davantage responsable de ces troubles digestifs (fréquence et consistance des selles, incontinence, impériosités, selles nocturnes) que le by-pass sauf dans une étude comparant 26 dérivations bilio-pancréatiques avec switch duodénal à 18 by-pass gastriques (Wasserberg 2008). Le fait que les patients by-pass ait un recul médian 2 fois moins important (10 mois) que les dérivations bilio-pancréatiques et que le recueil des données se soit effectué sur une période de 14 jours pourraient expliquer ces conclusions en sachant que les patients avec dérivation bilio-pancréatique allaient davantage à la selle que les by-pass (23,5 contre 16,5 épisodes). Dans l'étude citée plus haut (Potoczna 2008) comparant notamment 126 by-pass gastriques et 103 dérivations bilio-pancréatiques (incluant les 2 variantes), cette dernière procédure avait entraîné 10 fois plus de problèmes de diarrhées et de flatulences chez les patients par rapport à leur évaluation préopératoire avec une dégradation de 75 % par rapport à la situation considérée comme « normale». De la même manière, une étude prospective et randomisée scandinave a retrouvé, mais en ayant évalué seulement la moitié de la population de l'étude initiale, une

augmentation significative de la fréquence des selles après dérivation bilio-pancréatique avec switch duodénal par rapport au by-pass gastrique (4,1 ± 3,3 et 1,9 ± 1,1 selles par jour) mais aussi des épisodes d'incontinence (50 au lieu de 12,5 % des opérés) (Laurenius 2010). Cette fréquence de 3 à 4 selles par jour se trouve également rapportée de façon unanime par les principales séries de dérivation bilio-pancréatiques. Mais la chirurgie bariatrique peut aussi entrainer une constipation due aux changements alimentaires et notamment à la diminution de la prise de fibres (Afshar 2016). Malheureusement les études sont peu nombreuses, les investigations étant difficile et les mesures le plus souvent indirecte.

Concernant la modification ou non de la perméabilité, une étude a mis en évidence chez les patients 6 mois après un RYGB, que la perméabilité intestinale mesurée par le ratio lactulose/mannitol, ne semble pas significativement modifiée (Savassi-Rocha 2014) même si l'augmentation du taux de certaines protéines de jonctions serrées (claudines 3 et 4), rapportée dans une autre étude (Casselbrant 2015) pourrait évoquer une diminution de la perméabilité après chirurgie. Une étude comparant les différentes techniques chirurgicales a mis en évidence en 2015, que la biliodiversion a des effets beaucoup plus importants sur la malasorption et que finalement le RYGBP avait peu d'effets de malabsorption sévère. Il n'y avait pas de différences de temps de transit entre les différentes techniques (anneau, gastric bypass et biliodiversion). Mais le faible effectif de cette étude ne permet pas de conclure (6 anneaux, 7 RYGBP et 5 diversions) (Carswell 2014). Des analyses de perméabilité intestinale réalisées sur un plus grand nombre de patients issus de populations plus homogènes, combinant différentes approches expérimentales de mesure, incluant le passage des macromolécules, sont donc nécessaires pour étayer les conclusions quant à la pathogénicité de l'augmentation de la perméabilité intestinale dans l'obésité humaine. L'utilisation de stratégies d'analyse des données obtenues à partir des phénotypes cliniques et des mesures de perméabilité sera utile pour mieux stratifier les phénotypes complexes qui sont associés à l'obésité chez l'homme.

Ces phénomènes sont probablement dû à la modification histologique de la muqueuse comme le montre les études de l'équipe de Bado sur le rat (Cavin 2016 ; Arapis 2015). En effet, leurs études mettent en évidence ex vivo une hypertrophie des cellules mucipares dans l'estomac après le RYGBP ou la sleeve gastrectomie.

Plusieurs travaux récents ont montré qu'une diminution de l'absorption intestinale des lipides pourrait permettre de réduire l'endotoxémie post-prandiale (Erridge 2007, Laugerette 2011). Plusieurs études chez l'homme ont déjà démontré une corrélation positive entre lipides ingérés, endotoxémie, diabète et inflammation (Laugerette 2011). Le bypass gastrique entraînant d'importantes modifications du microbiote diminuerait l'absorption des lipides et l'inflammation chronique de bas grade en lien avec l'obésité. La baisse de l'inflammation chronique en lien avec la réduction de la lipémie post-prandiale permettrait d'améliorer la sensibilité à l'insuline et les paramètres métaboliques (Tuomi 2016). Une récente étude de Furet et al a démontré une augmentation de l'espèce Faecali bacterium prausnitzii dans la flore intestinale après bypass gastrique : cette bactérie serait directement liée à la diminution de l'inflammation chronique de bas grade et négativement corrélée au diabète, indépendamment de l'apport calorique (Furet 2010). Dans cette étude, les auteurs constataient également une augmentation du ratio bacteroidetes/firmicutes, déjà observée auparavant en cas de perte pondérale, mais cette baisse apparaissait hautement corrélée à l'apport calorique. Ainsi, il semble que les composantes du microbiote intestinal changent effectivement après RYGBP et que certaines espèces impacteraient directement l'état d'inflammation chronique et l'homéostasie glucidique. Enfin une étude récente paru dans Cell Metabolism en 2015, met en évidence qu'après ingestion de selles de patients ayant eu un RYGBP, les souris obèses ayant un syndrome métabolique retrouvent un poids normal, une amélioration de leurs sensibilités à l'insuline et une amélioration de leurs dyslipidémies. Cette étude met en évidence le rôle majeur du microbiote après chirurgie bariatrique (Tremaroli 2015).

En conclusion, les études sur la modification des fonctions digestives après chirurgie bariatrique sont peu nombreuses pour conclure, de plus des études plus fondamentales et mécanistiques sont indispensables afin de comprendre et d'expliquer l'adaptabilité du système digestif et les modifications des comorbidités (diabète, dyslpidémie, asthme,…). Notre travail s'est focalisé sur les effets à court terme de la sleeve gastrectomie sur la perméabilité para et trans cellulaire mais aussi sur les conséquences systémiques à court terme. Ces éléments n'ont encore jamais été étudiés.

Lors d'une chirurgie bariatrique, il existe une modification anatomique des structures digestives, celles-ci étant impliquées dans de nombreux mécanismes (voir plus haut) mais pas seulement. En effet l'intestin joue un rôle majeur dans le métabolisme du cholestérol. Or il existe une modification du profil lipidique après chirurgie bariatrique différentes en fonction des techniques opératoires. Dans cette 4ème partie de mon introduction, nous allons faire un rappel sur le métabolisme du cholestérol et les données actuelles connues sur les effets de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol, afin de mieux comprendre la problématique et les éléments étudiés lors de ma thèse.

4. Chapitre 4 : Le métabolisme du cholestérol

On estime à environ 147 000 par an le nombre de décès attribuable à une maladie cardiovasculaire en France, auquel s'ajoutent 120 000 infarctus et 150 000 accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Institut Veille Sanitaire 2009). Les conséquences sont également économiques : on évalue ainsi à 28 milliards d'euros par an les coûts liés à la prise en charge des maladies cardiovasculaires (Aouba 2007). De nombreuses études ont mis en évidence les effets bénéfiques d'une diminution de la concentration en LDL cholestérol (LDLc) sur le risque de développer une pathologie cardiovasculaire, ainsi que d'autres causes modifiables (hypertension, tabac, sédentarité,…). En effet, l'accumulation plasmatique de LDLc constitue une étape précoce dans le développement de l'athérosclérose, facteur de risque cardiovasculaire majeur.

Les lipides constituent une famille hétérogène de molécules hydrophobes, indispensables au fonctionnement de l'organisme. Les lipides peuvent être classés selon leur composition chimique et leur structure. Les principaux lipides sont les triglycérides (TG), les acides gras libres (AGL) qui sont utiles en tant que substrats énergétiques, les phospholipides (PL) et le cholestérol.

Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur le métabolisme du cholestérol en insistant particulièrement sur une nouvelle voie d'excrétion du cholestérol : le TICE (Excrétion Trans-intestinale du Cholestérol).

4.1. Généralités sur le cholestérol et fonctions du cholestérol

4.1.1. Généralités et origine du cholestérol : endogène et exogène

La molécule du cholestérol comprend quatre cycles carbonés, ou noyau cyclo-pentano-phénanthrénique, noté A, B, C et D (Figure 17). Le cholestérol possède un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3. Ce groupement chimique constitue la tête polaire et constitue donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau, on parle d'ester de cholestérol.

1/3 du cholestérol de l'organisme est apporté de manière exogène de fait de la consommation de produits d'origine animale. Les sources alimentaires majeures sont les fromages, le jaune d'œuf, la viande bovine et porcine. La synthèse endogène du cholestérol, qui apporte pour 2/3 du cholestérol, se fait dans le cytoplasme des cellules du foie et de l'intestin principalement. La synthèse débute par la condensation de trois molécules d'acétate en hydroxy-méthyl-glutarate (HMG). Cette synthèse est effectuée par l'HMG-CoA synthase (hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A synthase) en présence de coenzyme A, un cofacteur d'enzyme. L' hydroxy-méthyl-glutarate est ensuite réduit en mévalonate. Le mévalonate est ensuite décarboxylé en isoprènoïde à 5 carbones (l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate). La condensation de 6 molécules d'isoprènoïde aboutit finalement au squalène. Enfin, le squalène subit l'action de la squalène cyclase qui crée les cycles du cholestérol à partir des insaturations présentes dans le squalène (Figure 18).

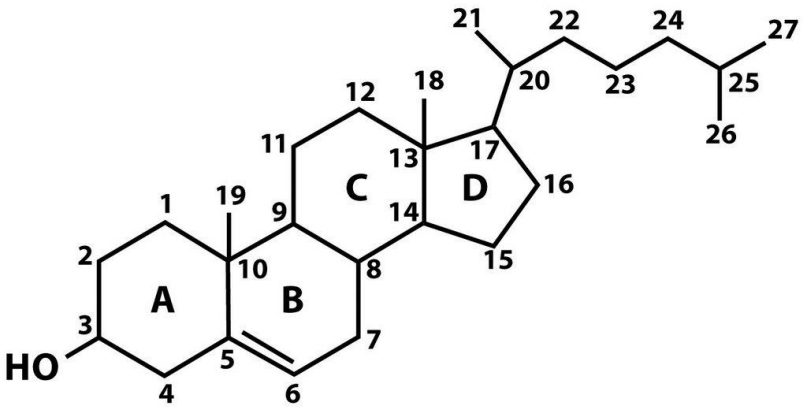


Figure 17 : Molécule cholestérol

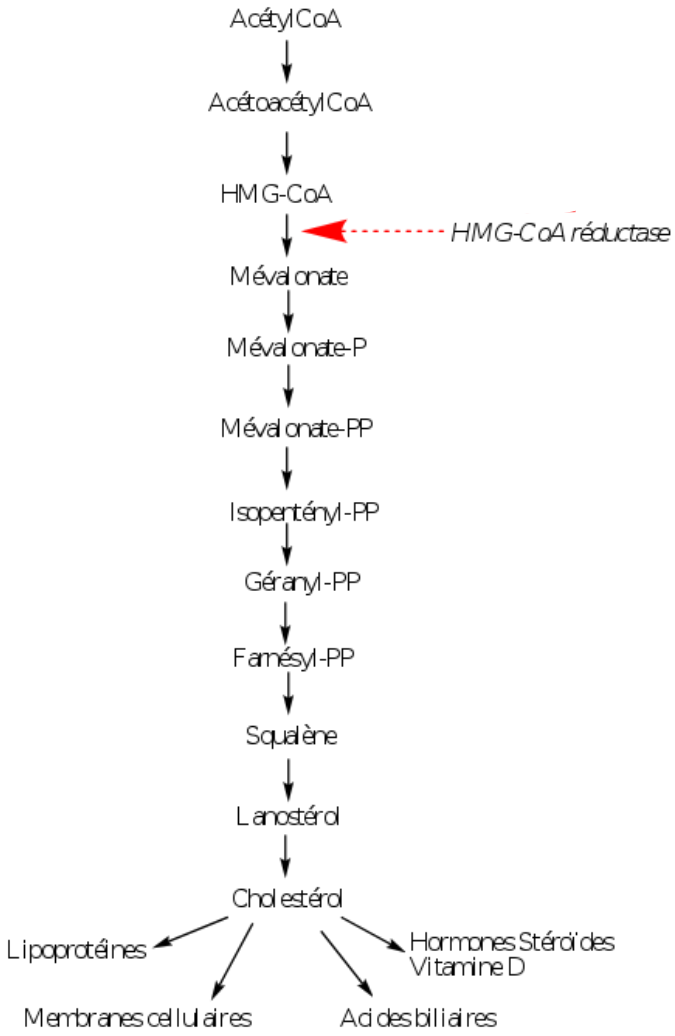


Figure 18 : Synthèse du cholestérol endogène

4.2. Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols. Il joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques de l'organisme humain. Dans la circulation sanguine le cholestérol est transporté sous forme libre ou estérifié par les lipoprotéines. Le cholestérol circulant est indispensable pour de nombreuses cellules qui le captent et l'utilisent pour la synthèse de leurs membranes. Le cholestérol des lipoprotéines est aussi le substrat de la synthèse des hormones stéroïdes dans les glandes endocrines et les gonades, de la vitamine D dans la peau et des acides biliaires dans le foie.

La concentration plasmatique de cholestérol dépend de ses voies d'apports exogène et endogène, de son métabolisme et de son transport. Son transport est assuré par quatre types de lipoprotéines (Figure 19).

1/ les lipoprotéines de basse densité (LDL- C) transportent le cholestérol dans le sang vers les cellules de l'organisme. Des taux très importants de LDL-C conduisent généralement au dépôt de cholestérol sur les parois des artères sous forme de plaque d'athérome ;

2/ les lipoprotéines à haute densité (HDL- C) le captent de nouveau au niveau des tissus extra hépatiques et le ramènent vers le foie ou il est dégradé ;

3/ les chylomicrons ;

4/ les lipoprotéines à très basse densité (VLDL) participent au transport des lipides vers le foie.

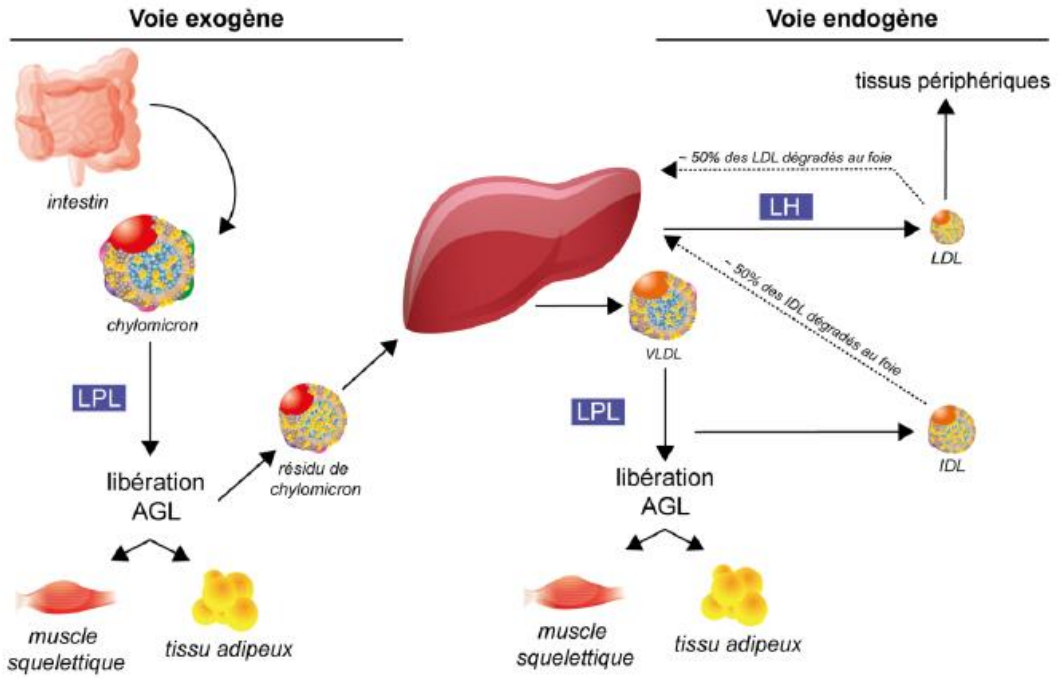
Le cholestérol peut être converti dans le foie en acides biliaires par la 7-alpha-hydroxylase et par le taux de réabsorption des sels biliaires par le cycle entéro-hépatique.

Le transport du cholestérol par les lipoprotéines se divise en 3 grandes voies :

- La voie exogène entéro-hépatique : principalement active en période postpandriale, elle permet le transport des lipides alimentaires de l'intestin vers le foie.

- La voie endogène d'apport aux tissus périphériques : c'est le transport des lipides du foie vers les cellules de l'organisme.
- La voie du transport inverse du cholestérol (RCT) : c'est le retour du cholestérol des cellules de l'organisme vers le foie.

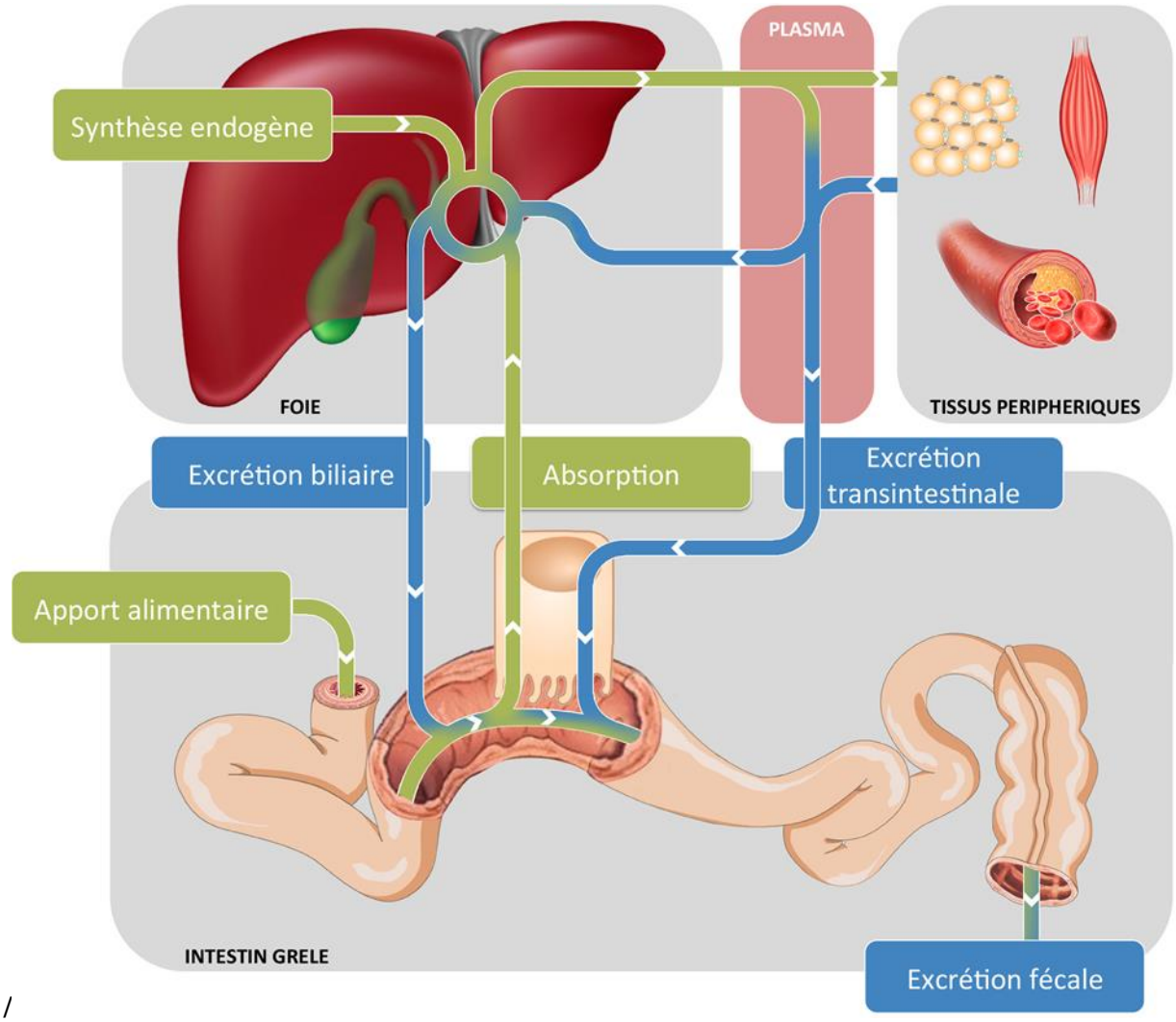
  Ces 3 voies vont vous être détaillées par la suite dans ce chapitre.



Légende. LPL : lipoprotéine lipase, AGL : acide gras libre, VLDL : lipoprotéine riche en triglycérides « *very low-density lipoprotein* », IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire « *intermediary density lipoprotein* », LDL : lipoprotéine de faible densité « *low-density lipoprotein* ». LH : lipoprotéine hépatique.

Figure 19 : Voie exogène et endogène du métabolisme des lipides

L'élimination du cholestérol se fait par la suite par 2 grandes voies : 1/ la voie biliaire jusqu'alors considérée comme l'unique mais 2/ une nouvelle a été mise en évidence : la voie excrétion trans intestinale du cholestérol (Figure 20).



/

Figure 20 : Principales voies d'apport (en vert) et d'excrétion (en bleu) du cholestérol dans l'organisme (adapté de Temel (2007) par F. Borel)

4.3. Les lipoprotéines et les apolipoprotéines

Les lipoprotéines sont des structures sphériques qui constituent un système de transport efficace de molécules hydrophobes (lipides) dans un milieu aqueux (sang, lymphe). Chaque lipoprotéine diffère selon sa taille, sa structure (caractérisée par son contenu en protéines, en lipides et en apolipoprotéines) ainsi que son rôle. Ces structures subissent des remaniements constants durant leur transit dans le plasma. Quelques heures suivant un repas, lorsque la quantité de chylomicrons est faible, les besoins en triglycérides des tissus périphériques sont assurés par les lipides synthétisés par le foie. La voie endogène correspond au transport des lipides produits par le foie et elle utilise plusieurs lipoprotéines : la lipoprotéine riche en triglycérides (very low-density lipoprotein, VLDL), la lipoprotéine de densité intermédiaire (intermediary density lipoprotein, IDL) et la lipoprotéine à faible densité (low-density lipoprotein, LDL). Les LDL et HDL sont majoritairement composés de cholestérol esterifié. La LDL est la lipoprotéine avec le contenu le plus riche en cholestérol, c'est-à-dire un peu plus de 50%, suite à plusieurs processus d'hydrolyse des triglycérides précédant sa formation. La LDL peut être captée par les tissus périphériques ou par le foie pour y être dégradée (Schwenke 1989). La VLDL est la lipoprotéine participant à la voie endogène du métabolisme du cholestérol qui a le contenu le plus riche en triglycérides. Les acides gras libres utilisés par le foie pour la formation des VLDL proviennent majoritairement de l'hydrolyse des chylomicrons et de la lipolyse du tissu adipeux (Shelness 2001). Comme les chylomicrons, l'hydrolyse des VLDL est effectuée par la lipoprotéine lipase des tissus périphériques (Katz 1954). (Figure 21).

Les apolipoprotéines (Apo) ont un rôle structural. Elles permettent le maintien du complexe macromoléculaire lors du transport depuis les sites de synthèse vers les sites d'utilisation. Elles ont aussi un rôle fonctionnel en assurant la reconnaissance des lipoprotéines avec les sites récepteurs et en activant certaines enzymes Les Apolipoprotéines B et A1 (Apo B

et A1) sont les apolipoprotéines les plus importantes. L'ApoB est retrouvée au sein des lipoprotéines dites athérogènes : LDL et VLDL. Pour exemple, l'Apo B100 est à l'origine de la formation de la lipoprotéine VLDL (Shelness 2001).

L'importance de la classification des lipoprotéines repose sur le fait que de nombreuses études ont montré que le risque de maladies cardiovasculaire (CV) est positivement associé aux lipoprotéines de faible densité. Inversement, les particules de haute densité semblent plutôt associées à une réduction du risque (Gordon 1977), même si une dernière étude d'analyse mendélienne publiée dans Lancet ne retrouve pas une association constante et forte entre le HDL cholestérol et le risque CV (Voight 2012).

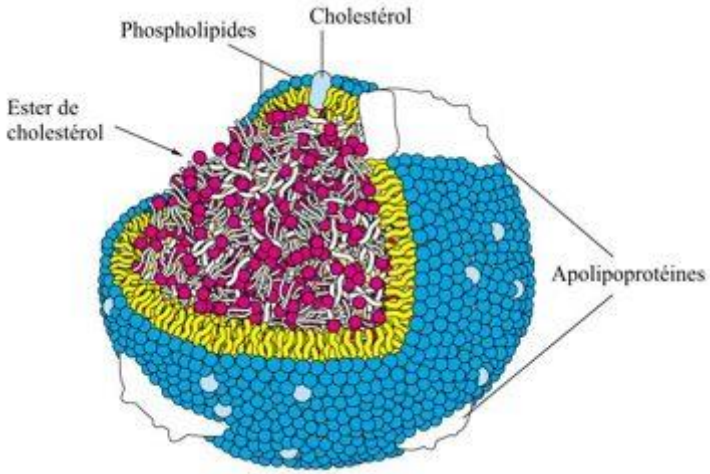


Figure 21 : Schéma de la structuration des lipoprotéines

4.4. La voie exogène entéro-hépatique

Comme son nom l'indique, cette voie est la voie du cholestérol apporté par l'alimentation et absorbé au niveau intestinal. Elle représente environ 1/3 du cholestérol apporté quotidiennement, les 2/3 restants étant la voie endogène.

4.4.1. Absorption intestinale

On estime qu'environ 50% du cholestérol présent dans la lumière intestinale est absorbé, le reste est directement éliminé dans les fèces (Bosner 1999). Le régime alimentaire apporte en moyenne 400-500 mg de cholestérol par jour (Wang 2007). Le cholestérol d'origine biliaire représente quant à lui de 800 à 1200 mg de cholestérol par jour faisant du cholestérol biliaire la source la plus importante de cholestérol pour l'absorption intestinale via le cycle entérohépatique.

Les acides biliaires ont un rôle clé dans l'absorption intestinale. En effet dans les modèles animaux, génétiquement modifié (ex : déficience CYP7A1) ou au canal cholédoque ligaturé, l'absence d'acides biliaires réduit considérablement l'absorption intestinale du cholestérol (Voshol 2001, Ponz de Leon 1981). De plus, la nature des acides biliaires présents au sein des micelles va avoir une influence sur l'absorption du cholestérol (Wang 2003). Ce qui par la suite va avoir une importance avec la modification de la composition des acides biliaires, à la suite de chirurgie bariatrique (Chapitre 5.5.3). En effet, Wang *et al.* ont montré chez des souris une corrélation positive entre l'indice d'hydrophobicité du pool d'acides biliaires et l'absorption intestinale du cholestérol (Wang 2003). Les acides biliaires les plus hydrophobes (l'acide cholique et l'acide deoxycholique) augmentent fortement la solubilisation micellaire du cholestérol et de ce fait, favorisent son absorption.

Avant que les molécules de cholestérol présentes dans la lumière intestinale puissent interagir avec ses transporteurs présents au sein de la bordure en brosse des entérocytes, elles doivent passer une barrière aqueuse (100-500µm) dite de diffusion localisée à l'interface lumière-intestinale-membrane apicale entérocytaire. La diffusion des molécules de cholestérol à partir des micelles à travers cette couche non agitée est un processus relativement lent (Wang 2007).

Par la suite le cholestérol va être internalisé dans la cellule par l'action de différents transporteurs membranaires. On en distingue 4 principaux : NPC1L1, SRB1, CD36 et ABCG5/G8.

Le cholestérol libre (CL) est principalement capté par le transporteur Niemann Pick C1 Like 1 (NPC1L1) puis internalisé dans la cellule entérocytaire (Altmann 2004). Ce transporteur exprimé au niveau de la membrane apicale des entérocytes est inhibé par l'ézétimibe, une molécule hypocholestérolémiante utilisée en clinique (Oikawa 2016). En effet, chez des souris déficientes pour NPC1L1, l'absorption intestinale de cholestérol radiomarqué administré par gavage est réduite de 69% par rapport à des souris contrôles. Un traitement à l'ézétimibe chez ces animaux n'entraîne pas de baisse supplémentaire de l'absorption du cholestérol, suggérant une action de l'ézétimibe dépendante de NPC1L1 (Altmann 2004).

SRB1 (Scavenger Receptor class B type 1) est une protéine transmembranaire exprimée au niveau intestinal et plus particulièrement au niveau des membranes apicales et basolatérale des entérocytes (Cai 2004). En 1998, Hauser *et al.* ont montré que ce transporteur était impliqué dans l'absorption entérocytaire du cholestérol alimentaire (Hauser 1998). En 2006, l'équipe de Collet *et al.* met en évidence que chez des souris surexprimant SRB1 spécifiquement au niveau intestinal, l'absorption du cholestérol est augmentée (Bietrix 2006). Mais contrairement à NPC1L1, SRB1 a une implication secondaire et non limitante de SRB1 dans l'absorption du cholestérol. En effet, l'invalidation totale de SRB1 chez la souris entraine

une légère augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol sous régime standard (Mardones 2001).

CD36 est une glycoprotéine membranaire qui est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales de l'intestin mais son implication dans l'absorption intestinale semble être facilitatrice mais non indispensable à elle seule (Nguyen 2009). Son rôle dans l'absorption n'est pas encore élucidé. En 2009, Nguyen *et al*. mettent en évidence que chez les animaux déficients pour SRB1 et/ou CD36, l'efficacité absorptive au niveau de la membrane de la bordure en brosse des entérocytes est équivalente à celle des souris contrôles sous régime standard (Nguyen 2009). Cette étude renforce donc l'hypothèse d'un effet facilitateur mais non limitant de l'absorption du cholestérol par les transporteurs SRB1 et CD36. Nasir et al. ont mis en évidence quant à eux que la délétion du gène du CD36 diminue le captage des AGLC par les entérocytes isolés (dépourvus de couche d'eau non agitée) (Nassir 2007), ou n'a pas d'effet (Drover 2005). Quoiqu'il en soit, ces altérations potentielles ne se traduisent pas par une diminution de l'absorption nette des lipides puisque les souris KoCD36 n'excrètent pas plus 48 mg de lipides dans les fèces en régime normolipidique (Nauli 2006; Nassir 2007; Drover 2008).

Deux autres protéines exprimées au niveau de la membrane apicale des entérocytes qui appartiennent à la famille des ABC (Adenosine triphosphate Binding Cassette) transporteurs : ABCG5 et ABCG8 sont également impliquées dans l'absorption intestinale du cholestérol. Pour être fonctionnelles ces protéines doivent être hétérodimérisées. ABCG5/G8 forme un transporteur qui est présent au sein de la membrane apicale des entérocytes (Heinemann 1991) et qui régule négativement l'absorption intestinale du cholestérol (Berge 2000). Au niveau hépatique, elles jouent un rôle dans l'efflux biliaire du cholestérol. Chez l'homme, une mutation dans le gène codant pour l'une ou l'autre de ces protéines, entrainent une beta-sitostérolémie (accumulation de phytostérols). Les souris déficientes pour ABCG5/G8 ont une

sécrétion en cholestérol biliaire diminuée mais par contre aucun effet n'est observé sur l'absorption intestinale (Yu 2002). Cependant, la surexpression d'ABCG5/G8 chez la souris induit une diminution de l'absorption du cholestérol ce qui suggère, que, dans certaines conditions, ces protéines jouent un rôle dans l'efflux du cholestérol au niveau intestinal (Yu 2002).

L'absorption intestinale du cholestérol est modulée par différents acteurs moléculaires : des récepteurs nucléaires tels que LXR (Liver X Receptor) avec 2 isoformes (LXRα et LXRβ), PPARδ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta) et des acteurs nutritionnels tels que les phytostérols (Repa 2000). Chez la souris, l'activation de LXR par le T0901317 induit une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol due à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'efflux entérocytaire du cholestérol tels que l'hétérodimère ABCG5/G8 (Yu 2002). En outre, l'expression génique de NPC1L1 est également diminuée dans l'intestin par un traitement avec un agoniste de LXR (Duval 2006).

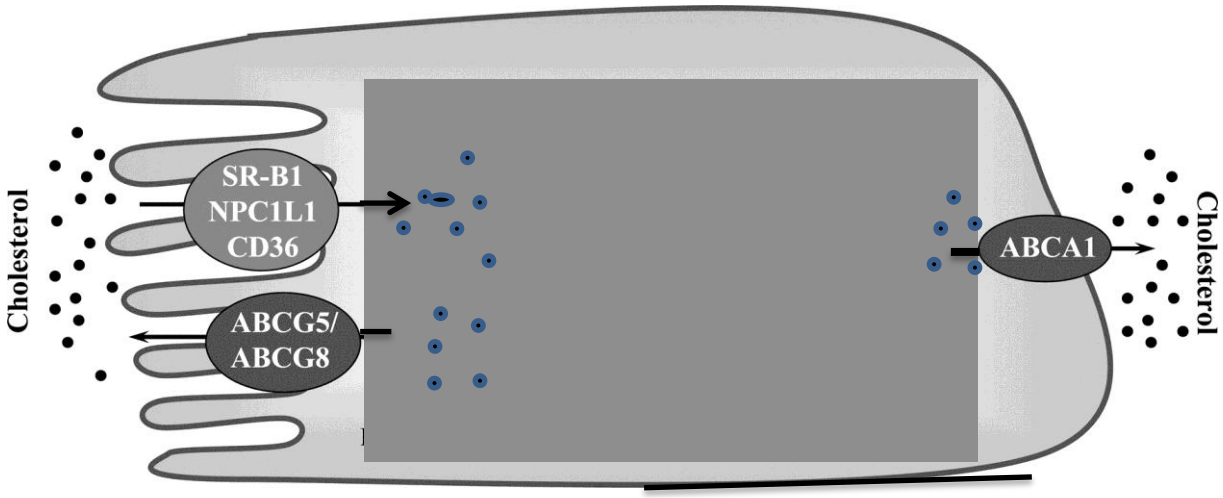


Figure 22: Schéma absorption intestinale du cholesterol (ravid 2008)

Après régime hyperlipidique, il existe une modification de l'absorption du cholestérol. En effet, celui-ci entraine une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol, probablement dû à un phénomène adaptatif de l'organisme à l'excès de cholestérol dans l'organisme. Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation négative entre le BMI et l'absorption intestinale du cholestérol, suggérant ainsi une diminution de celle-ci chez les patients obèses (Gylling 2007 ; Ooi 2009).

Après chirurgie bariatrique, grâce à l'étude du cholestérol non absorbé par spectrométrie de masse (campestérol, sitostérol, avenastérol et cholestanol), la littérature a mise en évidence que le RYGBP chez l'homme diminue l'absorption du cholestérol alors que l'anneau gastrique quant à lui ne le modifie pas. L'hypothèse principale est la modification du pool acides biliaires et donc de la micellisation après chirurgie notamment malabsorptive (Philajamaki 2010, Benetti 2013, Bays 2016).

4.4.2. Export entérocytaire du cholestérol absorbé

Après avoir été absorbé au pôle apical des entérocytes, le cholestérol est estérifié par l'enzyme ACAT2 (Acylcoenzyme 17 cholesteryl acyltransferase 2) au niveau du réticulum endoplasmique, avant d'être ensuite assemblé dans les chylomicrons. Les chylomicrons sont synthétisés exclusivement dans l'intestin pour transporter les lipides et les vitamines liposolubles alimentaires dans le sang. Les chylomicrons sont de très grosses particules sphériques riches en triglycérides. Le coeur de cette lipoprotéine est composé de triglycérides, de cholestérol ester et de vitamines liposolubles, alors que sa surface est composée d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insèrent du cholestérol libre et diverses apolipoprotéines comme l'apoA-I, l'apoA-IV et les apoC, l'apolipoprotéine principale étant l'apoB48.

Sécrétés dans la lymphe mésentérique, les chylomicrons vont rejoindre la circulation générale *via* le canal thoracique. Sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) liée à l'endothélium des vaisseaux et activée par l'apoCII, les triglycérides transportés par les chylomicrons vont être hydrolysés en acides gras libres qui diffuseront librement dans les cellules où ils seront, soit oxydés pour produire de l'énergie (muscle), soit ré-estérifiés pour être stockés (tissus adipeux). Ayant perdu la plus grande partie de ses triglycérides par l'action de la LPL, le chylomicron est relativement enrichi en ester de cholestérol pour former une particule plus dense et de plus petite taille : le remnant de chylomicron. Cette diminution de taille s'accompagne d'une perte des composés de surface (apoA-I, apoCII et phospholipides) qui sont pris en charge par les HDL. Les remnants vont être rapidement captés par le foie pour être catabolisés. Seuls les remnants de taille inférieure à 100 nm vont pouvoir passer au travers des fenêtres de la barrière endothéliale et pénétrer dans l'espace de Disse au contact des hépatocytes (Fraser 1995). La captation hépatique des remnants de chylomicrons fait majoritairement intervenir le récepteur des LDL (LDLR) et le récepteur LRP (LDL receptor-related protein). Le récepteur SR-B1 est également impliqué dans la captation des remnants, en effet des souris surexprimant SR-B1 au niveau hépatique présentent une augmentation du catabolisme des remnants de chylomicrons (Amburad 2012). Une fois captées, les particules d'ester de cholestérol vont être hydrolysées dans le lysosome, et une grande proportion du cholestérol résultant de cette hydrolyse sera ré-empaquetée et sécrétée par le foie sous la forme de VLDL. Les résidus de triglycérides (TG) restant dans les remnants de chylomicrons constituent également une source importante d'acides gras (AG) pour la formation des VLDL (Jung 1999).

Il existe une autre voie de sécrétion du cholestérol absorbé par l'entérocyte qui est indépendante de l'apoB48 (Iqbal 2005). In vitro, Iqbal *et al.* ont montré sur un modèle de cellules intestinales Caco-2 et sur des entérocyes primaires issus de souris déficientes en ApoA1 que le cholestérol peut être secrété au niveau de la membrane basolatérale des

entérocytes vers des lipoprotéines à ApoA1 (Iqbal 2005). Cette voie semblerait être médiée par le transporteur ABCA1. En effet des souris déficientes en ABCA1 spécifiquement au niveau intestinal présentent une diminution de 30% de la quantité de HDL plasmatique (Brunham 2006).

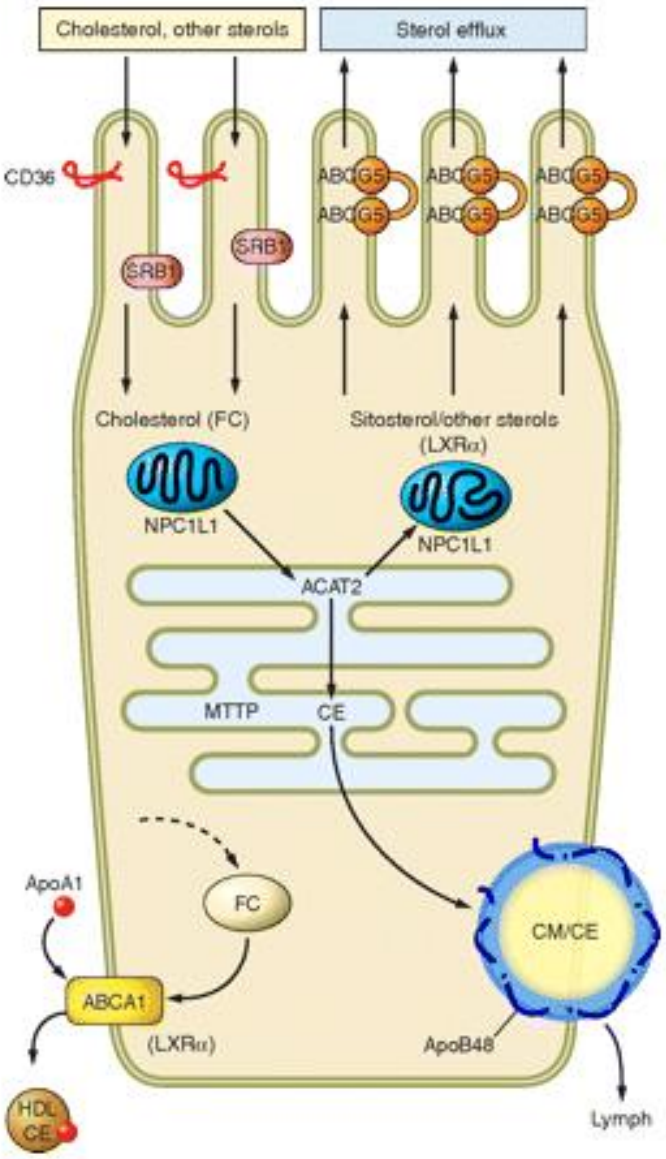


Figure 23 : Export entérocytaire du cholestérol absorbé (Abumrad 2012)

4.5. La voie endogène

4.5.1. Synthèse endogène hépatique et rôle des facteurs de transcription SREBP2

Toutes les cellules sont capables de synthétiser le cholestérol qui constitue un composant essentiel des membranes cellulaires et un précurseur de diverses molécules telles que les hormones stéroïdiennes, les vitamines, les acides biliaires qui sont impliqués dans différents processus biologiques. Quantitativement le site principal de synthèse du cholestérol est le foie. L'étape limitante dans cette synthèse est la conversion d'une molécule d'HMG-CoA en mévalonate qui est catalysée par l'HMG-CoA réductase, cible des statines (Figure 18). La régulation de l'HMG-CoA réductase est très importante dans l'homéostasie du cholestérol. Cette enzyme-clé de la synthèse du cholestérol peut être régulée par des mécanismes de rétrocontrôle déclenchés par différents produits du métabolisme du mévalonate au niveau de la transcription, de la traduction, de l'activité catalytique ainsi qu'au niveau de son taux de dégradation. Le principal mécanisme modulateur de l'HMG-CoAréductase est le rétrocontrôle effectué par le cholestérol.

La régulation transcriptionnelle de l'HMG-CoA réductase est sous la dépendance des SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein) qui activent la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol. Des modèles de souris transgéniques surexprimant les formes nucléaires des SREBPs dans le foie ont permis d'identifier les gènes cibles des différentes isoformes de SREBP. Ainsi, l'isoforme SREBP-2 active préférentiellement la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol tandis que SREBP-1a et SREBP-1c induisent la transcription de gènes impliqués dans la lipogenèse (Horton 2003).

La régulation des concentrations de cholestérol intracellulaire est régulée par la suite par différentes protéines : ABCG5/G8, LXR, CYP7A1, SRB1, dont leurs mécanismes d'action seront détaillés dans les prochains chapitres.

4.5.2. L'apport du cholestérol aux tissus

Les VLDL hépatiques sont des lipoprotéines synthétisées au niveau du foie qui contiennent une grande quantité de triglycérides et une moindre quantité de cholestérol et de phospholipides. Le mécanisme moléculaire de synthèse et de sécrétion des VLDL hépatiques est très proche de celui des chylomicrons intestinaux. Contrairement aux chylomicrons produits dans l'intestin, c'est l'apoB100 et non l'apoB48 qui est essentielle à l'assemblage des VLDL dans le foie. L'assemblage des VLDL est initié dans le RE et comporte différentes étapes se déroulant pendant et après la traduction et la translocation de l'apoB100 au travers de la membrane du RE. La sécrétion des VLDL matures nécessite un transport vésiculaire du RE vers l'appareil de Golgi. Après leur passage dans l'appareil de Golgi, les VLDL sont rassemblées dans des vésicules sécrétoires, transportées à la membrane plasmique et sécrétées dans l'espace de Disse, puis dans la circulation générale.

4.5.3. Captation du cholestérol

Dans le compartiment vasculaire, les VLDL hépatiques comme les chylomicrons vont subir l'hydrolyse de leurs triglycérides par la LPL activée par l'apoCII présente à la surface des VLDL. Contrairement à la souris, l'homme possède la CETP (Cholesterol Ester Transfert

Protein), notamment responsable des échanges de TG et d'ester de cholestérol entre les VLDL et les HDL (Barter, 2000). Différentes études ont été réalisés ciblant le CETP, mais aucune n'a montré d'efficacité pour le moment, certains ont du être arrêtées pour cause d'augmentation de mortalité (Barter 2015). Comme dans la dégradation des chylomicrons, l'hydrolyse des triglycérides induit des replis de l'enveloppe périphérique qui sont libérés dans la circulation, constituant un départ des apoC, de phospholipides et de cholestérol libre. Ainsi des édifices plus petits, enrichis en apoB100 et E, se restructurent autour des esters de cholestérol et des molécules restantes de triglycérides formant des IDL (Intermediate Density Lipoprotein) ou remnants de VLDL. Dans les capillaires sinusoïdes du foie, ces IDL sont ensuite transformées en LDL sous l'action de la lipase hépatique qui va hydrolyser les triglycérides restants. Au cours de la lipolyse, les lipoprotéines subissent un véritable remodelage de leur structure car la perte importante de triglycérides induit une diminution de la taille des particules qui est corrélée avec une perte des composés de surface tels que les apoC et E.

Ainsi, à la différence des VLDL et IDL, les LDL qui sont très enrichies en cholestérol esters sont dépourvues d'apoC et contiennent uniquement une molécule d'apoB100 et quelques molécules d'apoE. Tout au long de la cascade de transformation VLDL-IDL-LDL, les lipoprotéines vont pouvoir être captées par leurs récepteurs spécifiques, grâce à la reconnaissance des apolipoprotéines qui les composent. Ainsi, la reconnaissance des VLDL se fait principalement par l'apoE alors que les IDL et LDL sont reconnues grâce à l'apoB100. La captation des LDL, bien que majoritairement hépatique, a lieu dans toutes les cellules de l'organisme. Le principal récepteur responsable de la clairance plasmatique des LDL est le LDLR.

4.5.4. le LDLR

Le LDLR est un élément clé dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme. Il joue le rôle d'une véritable interface entre les taux de cholestérol extra et intracellulaire et il est lui-même sujet à régulation. Les individus possédant une mutation dans le gène codant pour le LDLR souffrent de la plus commune des formes autosomales dominantes d'hypercholestérolémie familiale, qui se manifeste par des taux très élevés de LDL-cholestérol et un risque très élevé d'évènement CV précoce (Grenkowitz 2016).

La captation des LDL *via* le LDLR est un processus maintenant bien connu qui fait intervenir différentes étapes successives. Après la liaison de la particule LDL au domaine de liaison extracellulaire du LDLR, le complexe récepteur-ligand est internalisé par endocytose *via* des vésicules recouvertes de clathrine. Ce complexe est ensuite libéré dans un endosome où l'acidification induite par l'activité de l'ATPase type V facilitera la dissociation de la liaison ligand-récepteur. La particule LDL sera ensuite transportée vers le lysosome, où les particules de cholestérol ester seront hydrolysées en cholestérol et acides gras alors que l'apoB100 sera dégradée en acides aminés. La plupart des molécules LDLR seront recyclées vers la membrane plasmique où elles pourront se lier à nouveau aux particules LDL (Lopez 2008). Pour chaque cycle, seulement un très faible pourcentage de LDLR adressés vers l'endocyotse est dégradé. Il est estimé que chaque molécule de LDLR réalise environ 150 cycles (Lopez 2008).

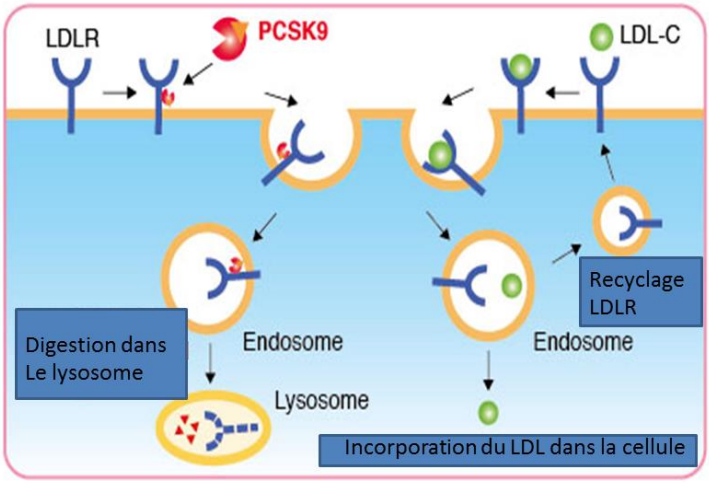


Figure 24 : Captation du LDL par le LDLr

4.5.5. PCSK9

La Pro-protéine Convertase Subtilisin Kexin de type 9 (PCSK9) a été co-découverte en 2003 par une équipe française experte en génétique de l'hypercholestérolémie familiale dirigée par Catherine Boileau et un groupe canadien leader dans le domaine des proprotéines convertases dirigé par Nabil Seidah. PCSK9 est le 3ème gène responsable de l'hypercholestérolémie familiale. Des patients porteurs de mutations dites «gain de fonction» pour PCSK9 se caractérisent par une hypercholestérolémie et un risque accru d'avoir un évènement cardiovasculaire précoce (Abifadel 2003). A l'inverse, une équipe américaine a mis en évidence que des mutations «perte de fonction» réduisent la cholestérolémie et surtout entraînent une protection massive (-88%) vis à vis des évènements CV (Cohen 2005).

PCSK9 est majoritairement exprimée dans le foie, l'intestin et les reins. PCSK9 est synthétisée sous forme de précurseur de 75kDa. Elle subit un auto-clivage dans le réticulum endoplasmique, ce qui permet sa sortie du RE et sa sécrétion dans la circulation sanguine (Seidah 2003). Ainsi, PCSK9 se comporte comme une hormone en agissant à distance de son

site de production (Lagace 2006). PCSK9 est un inhibiteur naturel des récepteurs au LDL (LDL-R). PCSK9 se fixe sur le domaine EGF-A (Epidermal Growth Factor type A) du LDL-R, entraine son internalisation et favorise sa dégradation par le lysosome (Horton 2007).

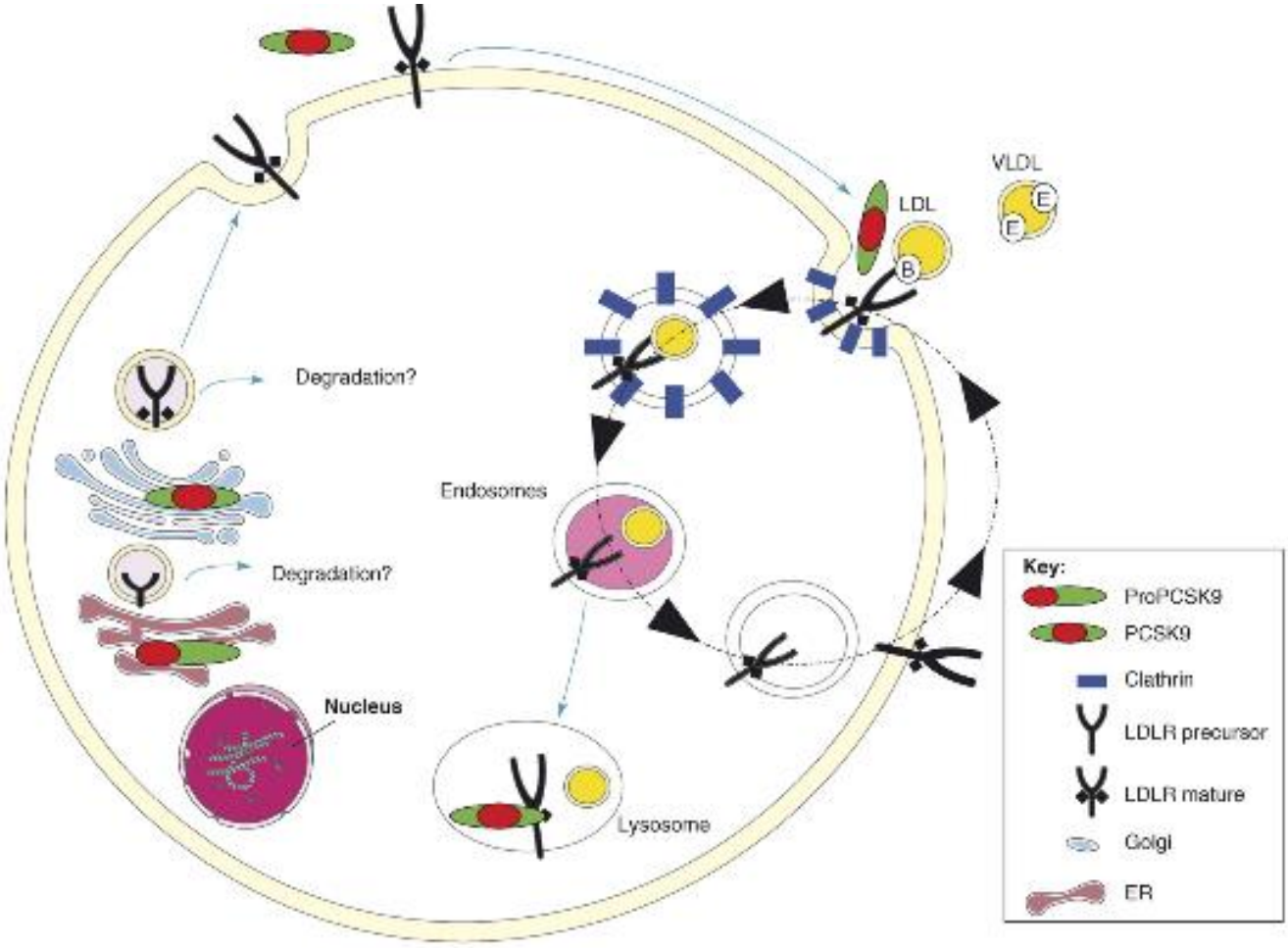


Figure 25 : Schéma de la synthèse et du rôle de PCSK9 hépatique (Costet 2008)

Le rôle de PCSK9 a été intensivement étudié dans le foie. Les souris présentant une invalidation totale ($PCSK9^{-/-}$) ou hépatique ($PCSK9^{Foie-/-}$) de PCSK9 ont une réduction respective de leur cholestérolémie de 42 et 27% par rapport aux souris contrôles sauvages (Zaid 2008) suggérant qu'un tiers de la baisse de cholestérolémie des souris $PCSK9^{-/-}$ est lié à une action extra hépatique de PCSK9. Mon équipe d'accueil a largement contribué ces dernières années à l'exploration de ces fonctions extra-hépatiques notamment dans le pancréas endocrine, les reins et l'intestin (Cariou 2015).

Mon équipe d'accueil a montré que la déficience en PCSK9 altère significativement deux voies métaboliques intestinales : la lipémie postprandiale (Le May 2009) et le TICE (Le May 2013).

Par contre aucune étude n'est actuellement publiée afin d'évaluer s'il y avait une modification de la synthèse de PCSK9 après chirurgie bariatrique. Nous sommes actuellement en cours d'un travail collaboratif grâce à la cohorte de chirurgie bariatrique de Colombes (Dr Ledoux) afin d'étudier la modification ou non de cette synthèse après chirurgie.

4.6. La voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT)

La voie du RCT est cliniquement très importante car elle est antiathérogène contrairement à la voie endogène d'apport qui, en cas d'excès d'apport est proathérogène (Chapman 2006). Découverte par Glomset en 1968 (Glomset 1968), elle permet de prévenir l'accumulation de cholestérol dans les macrophages, réduisant alors le risque d'athérosclérose (Rosenson 2012). Le RCT peut être décomposé en différentes étapes (Figure 20) : l'efflux du cholestérol excédentaire des tissus périphériques et des macrophages vers l'apoA-I, libre ou faiblement lipidé (prébHDL), la maturation et le remodelage plasmatique de ces particules HDL néoformées et enfin la captation des HDL par le foie via SRB1 et P2Y13 (Fabre 2010).

Par la suite le cholestérol va être éliminé dans la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires. Il s'agit de l'étape ultime d'excrétion du cholestérol. La propriété athéroprotectrice des HDL est principalement attribuée à leur participation dans cette voie de transport retour du cholestérol.

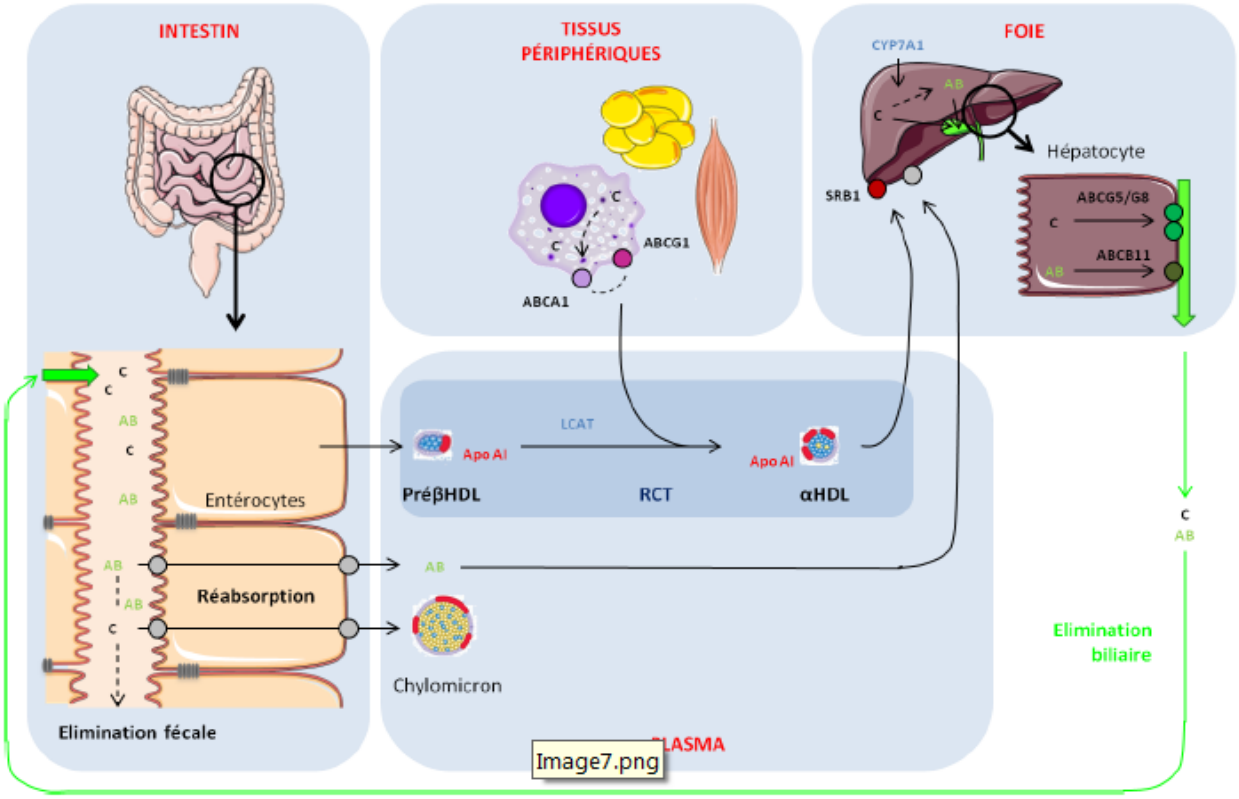


Figure 26 : Réprésentation schématique de la voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT)

L'excrétion biliaire était considérée encore il y a quelques années comme la seule voie d'élimination du cholestérol. Récemment, une autre voie d'élimination du cholestérol plasmatique directement par l'intestin, appelée TICE (Transintestinal Cholesterol Excretion), a été mise en évidence par l'équipe du Pr. Groen (van der Velde 2007). Ces 2 voies correspondent donc aux étapes ultimes de l'excrétion du cholestérol et seront détaillées dans la section 3.7 de ce chapitre.

4.7. Les voies d'élimination du cholestérol

4.7.1. L'élimination biliaire

L'élimination biliaire du cholestérol soit sous forme libre soit après conversion en acides biliaires constitue l'ultime étape du transport retour du cholestérol. La biosynthèse des acides biliaires constitue un processus catabolique par lequel le cholestérol (composé hydrophobe insoluble) est converti en molécules solubles d'acides biliaires qui seront facilement sécrétées. Leurs propriétés détergentes sont très importantes pour leur fonction physiologique dans l'absorption des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles dans l'intestin grêle. Chez l'homme, cette biosynthèse des acides biliaires qui a lieu exclusivement au niveau du foie représente environ 50% de l'élimination du cholestérol dans l'organisme (Alrefai 2007). La synthèse et les métabolismes des acides biliaires seront détaillés par la suite dans le chapitre 5.

Le transport des acides biliaires du foie vers le canal biliaire est permis grâce à différents transporteurs : BSEP, MRP2 et ABCG5/G8 (Hylemon 2009). L'héterodimère ABG5/G8 est un des transporteurs les plus importants et composé de deux unités ABCG5 et ABCG8 qui sont principalement localisées sur la membrane apicale des cellules intestinales et sur la membrane canaliculaire des hépatocytes (Hylemon 2009). Ces protéines s'hétérodimérisent en un complexe fonctionnel pour permettre l'excrétion à la fois des stérols végétaux et du cholestérol vers la lumière intestinale et la bile. Le rôle d'ABCG5/G8 dans le transport du cholestérol dans la bile a été confirmé par des modèles de souris génétiquement modifiés. En effet, l'invalidation d'ABCG5/G8 chez la souris entraîne une diminution significative d'environ 75% de la concentration en cholestérol dans la bile qui se traduit par une diminution de l'élimination des stérols neutres dans les fèces (Yu 2002) alors qu'une surexpression de ces deux transporteurs entraîne une augmentation de la concentration de cholestérol biliaire (Yu 2002). Cependant il est important de noter que malgré la double

invalidation d'ABCG5/G8 on peut observer une sécrétion résiduelle de cholestérol dans la bile de ces souris. Ce transport du cholestérol dans la bile indépendant d'ABCG5/G8 pourrait être médié par SR-B1. Il a été montré que SR-B1 est également exprimé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et que sa surexpression entraîne une augmentation des sécrétions biliaires de cholestérol qui est maintenue chez les souris invalidées pour ABCG5/G8 (Wiersma 2009). NPC1L1 semble jouer également un rôle dans la sécrétion du cholestérol dans la bile chez l'homme. En effet, l'expression hépatique de NPC1L1 chez la souris, qui est physiologiquement absent au niveau hépatique chez cette espèce, entraîne une diminution de 10 à 20 fois de la concentration de cholestérol biliaire qui est associée à une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol (Temel 2007). Le traitement de ces souris avec l'Ezetimibe restaure un phénotype de souris sauvages. Il est proposé par les auteurs que NPC1L1 pourrait être responsable du transport retour du cholestérol de la bile vers l'hépatocyte au niveau de la membrane canaliculaire (Liu 2015).

La cosécrétion des acides biliaires primaires, du cholestérol et des phospholipides au travers de la membrane canaliculaire conduit à la formation de micelles mixtes dans la bile. La bile stockée dans la vésicule biliaire sera ensuite déversée dans la lumière du duodénum au moment d'un repas par contraction de la vésicule biliaire induite par la cholécystokinine. Dans la lumière de l'intestin grêle, les acides biliaires jouent le rôle de détergents pour solubiliser et faciliter l'absorption des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles. Due à leur faible pKa, l'absorption passive des acides biliaires conjugués est faible et leur concentration intraluminale reste donc élevée tout au long de l'intestin grêle. 90 à 95% des acides biliaires sont activement réabsorbés par l'action de transporteurs au niveau de l'iléum terminal.

4.7.2. L'excrétion transintestinale du cholestérol ou TICE

Jusqu'à récemment, l'excrétion biliaire de cholestérol était considérée comme la seule voie d'élimination du cholestérol plasmatique et la seule voie terminale du RCT. Le cholestérol plasmatique en excès est absorbé par le foie et réexcrété directement ou après conversion en acides biliaires dans l'intestin proximal via le canal cholédoque. La bile enrichie en cholestérol est ensuite éliminée de l'organisme dans les fèces (Ohashi 2005).

De nombreuses études ont révélé l'existence d'un découplage entre l'excrétion biliaire de cholestérol et l'excrétion fécale de cholestérol (Brufau 2011). Ainsi dès 1927, Sperry observa chez des chiens nourris avec un régime dépourvu de cholestérol et présentant une dérivation de la voie biliaire, une quantité anormalement élevée de cholestérol fécal, suggérant l'existence d'une voie alternative d'élimination du cholestérol (Sperry 1927). L'expérience et les conclusions ont été reproduites en 1973 par Pertsemlidis (Pertsemlidis 1973). Kruit *et al.* a mis en évidence chez les souris déficientes en transporteur ABCB4 (ATP-binding cassette, sous famille B, isoforme 4) (présentant un défaut d'excrétion biliaire des phospholipides et par voie de conséquence du cholestérol) une excrétion par voie fécale du cholestérol radioactif injecté par voie veineuse, ce qui suggèrent fortement l'existence d'une voie directe intestinale (Kruit 2005). La preuve directe de l'existence de cette voie chez la souris a été apportée par Van Der Velde AE. *et al.* en 2007. Ils ont réalisé une dérivation de l'excrétion biliaire et perfusé la lumière intestinale avec une solution de Krebs. Quinze minutes après l'injection intraveineuse de cholestérol radioactif, ils ont observé l'apparition de ce cholestérol dans les perfusats intestinaux (van Der Velde 2007). L'activité du TICE est maximale dans la partie proximale de l'intestin puis décroit progressivement tout au long du tractus digestif. Deux études, publiées la même année par ce groupe, font ressortir le rôle stimulateur des protéines LXR et PPARδ sur l'excrétion transintestinale de cholestérol (Carlos 2009 ; van der Veen JN 2009). Enfin, ils soutiennent que 33 % du cholestérol retrouvé dans les fèces proviendrait du TICE alors que

seulement 17 % serait d'origine biliaire, faisant ainsi du TICE une voie majeure d'épuration du cholestérol chez la souris. Actuellement les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués restent à découvrir. De plus, l'inhibition de la réabsorption intestinale du cholestérol par un traitement par Ezetimibe stimulerait également le TICE (Jakulj 2010). Le May et al. a démontré qu'à la fois les LDL et les HDL sont capables de fournir du cholestérol au TICE. Ils ont également déterminé l'importance fonctionnelle du LDLr dans le TICE. Ainsi, la modulation de son expression intestinale par un régime enrichi en lovastatine ou par son inhibiteur physiologique PCSK9, affecte le flux de TICE (Le May 2013). En revanche, les souris LDLr KO ne présentent pas de TICE réduit démontrant que ce récepteur n'est pas indispensable au TICE et suggérant l'existence d'autres transporteurs capables de compenser son absence. Enfin, ils mettent en évidence que la protéine ABCB1 contribue avec l'hétérodimère ABCG5/8 à la prise en charge de l'efflux de cholestérol de l'entérocyte vers la lumière intestinale.

Quatre études se sont intéressées à tester l'implication du TICE dans la voie anti-athérogène du transport inverse du cholestérol et aboutissent à des contradictions. Le transport inverse permet le retour du cholestérol des tissus périphériques (notamment le cholestérol contenu dans les macrophages de la paroi artérielle) vers le foie. La première étude montre qu'une dérivation biliaire n'altère pas de façon significative l'excrétion fécale du cholestérol des macrophages et suggère que le TICE fait partie intégrante de la voie inverse du cholestérol (Temel 2010). La seconde étude montre, à l'inverse, que le TICE ne semble pas être impliquée dans ce processus de transport inverse du cholestérol (Nijstad 2011). Cette dernière observation a été renforcée par une seconde étude reposant sur l'utilisation de souris NPC1L1 KO sur-exprimant ou non la protéine NPC1L1 au niveau hépatique. Chez ces souris NPC1L1 KO, caractérisées par un défaut majeur d'absorption intestinale de cholestérol, l'élimination du cholestérol macrophagique par la voie du RCT est dépendante d'une voie hépatobiliaire pleinement fonctionnelle (Xie Ping 2013). Toutefois, une étude récente renforce l'importance fonctionnelle du TICE dans le RCT. En effet, l'inhibition pharmacologique de la MTP stimule

le RCT et l'excrétion fécale de cholestérol marqué d'origine macrophagique sans pour autant augmenter l'excrétion biliaire de cholestérol marqué, suggérant le rôle de l'intestin (Dikkers Arne 2014). En conclusion, la question du rôle du TICE dans le RCT demeure controversée. D'autres études seront donc nécessaires pour valider ou réfuter l'importance du TICE dans la voie anti-athérogène du transport inverse du cholestérol.

Concernant les données chez l'homme et son existence ou non, deux études anciennes suggèrent indirectement que le TICE existe chez l'homme. En 1959, une étude mesurant l'apport en cholestérol alimentaire, l'absorption intestinale du cholestérol et l'excrétion fécale du cholestérol chez des patients ayant une obstruction complète du canal biliaire en raison d'un carcinome de la tête du pancréas a clairement établi l'existence d'une sécrétion de cholestérol par la muqueuse intestinale (Cheng 1959). De même, Simmons et *al*. ont confirmé l'existence d'une telle voie en utilisant un système de ballonnet endoluminal à triple lumière positionné dans le jéjunum sur une longueur de 50 cm. Par cette technique, le pourcentage de cholestérol excrété par l'intestin a été estimé à environ 44% de la production fécale totale (Simmonds 1967). La première preuve que l'intestin humain est capable d'excréter du cholestérol par voie intestinale a été apportée *ex vivo* en 2013. En utilisant des biopsies jéjunales montées sur des chambres d'ussing, le TICE fonctionne lorsque l'on apporte du cholestérol sous forme de LDL ou de HDL et qu'il est induit par l'ajout dans le compartiment apical de milieu enrichi en phospholipides et en acides biliaires (Le May 2013). Toutes ces données sont résumées dans cette revue (Blanchard 2014). Une étude très récente parue dans Cell en novembre 2016, met en évidence pour la première fois le TICE in vivo chez 15 volontaires masculins sains sans traitement hypocholestérolémiant, en utilisant une approche de mesure indirecte du cholestérol excrété par le TICE (Jakulj 2016). Dix participants ont répété le protocole après 4 semaines de traitement par l'ézétimibe (inhibiteur de l'absorption du cholestérol intestinal et biliaire). Dans les conditions basales, environ 65% de l'excrétion quotidienne de sterol neutre fécal était dérivé de la bile, le reste étant contribué par l'excrétion transitoire directe du cholestérol (TICE).

L'ézétimibe a quant à lui induit une augmentation de 4 fois de l'élimination du cholestérol via le TICE. Des études sur souris ont révélé que la majorité du flux TICE induit par l'ézétimibe serait médiée par le transporteur de cholestérol ABCG5 / ABCG8. En conclusion, le TICE semble être présent et actif chez l'homme et pourrait servir comme une nouvelle cible pour stimuler l'élimination du cholestérol chez les patients à risque de maladie cardiovasculaire. Cependant, cette étude chez l'homme est pratiquée sans canulation de la voie biliaire, pour des raisons évidente éthiques. Mon équipe d'accueil est actuellement en cours d'étude pour mettre en évidence par mesure directe l'existence du TICE chez l'homme. Le principe de cette étude consiste à mesurer chez un patient ayant une dérivation biliaire externe, à la suite d'une obstruction complète de la voie biliaire principale, le passage du D7 cholestérol injecté en IV dans les selles du patient. Deux patients ont été explorés et les résultats obtenus font l'objet d'une publication actuellement en cours d'écriture.

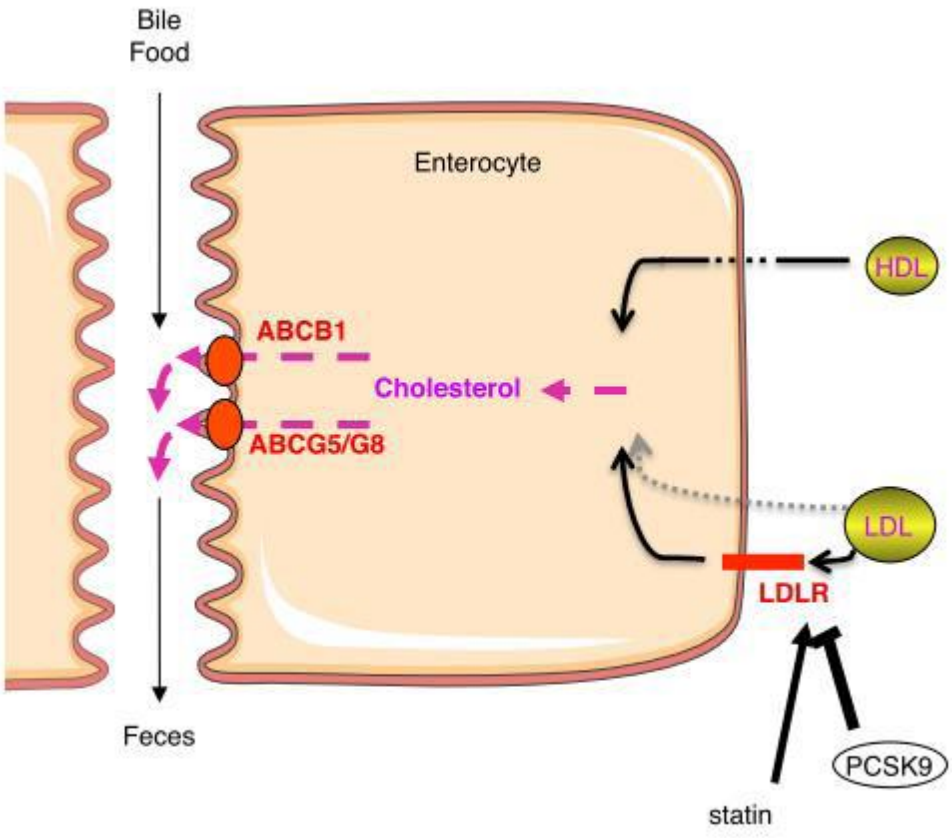


Figure 27: Représentation du TICE et de ses acteurs moléculaires (Le May 2013)

Dans notre travail, outre l'étude des modifications du métabolisme du cholestérol et notamment des voies d'élimination et plus précisement du TICE après chirurgie bariatrique, afin de comprendre pourquoi il existait une diminution de la cholestérolémie et plus précisement du LDL différente en fonctions des techniques opératoires. Nous nous sommes intéressés à l'impact de la chirurgie bariatrique sur les modifications du pool et de la composition des acides biliaires, dans le but in fine d'étudier la rélation de ces modifications sur le TICE et l'absorption intestinale du cholestérol.

5. Chapitre 5. Rôle des acides biliaires dans le métabolisme lipidique

5.1. Les acides biliaires : de nouveaux régulateurs métaboliques

Les AB sont des molécules amphiphiles avec un squelette stéroïdien, synthétisées à partir du cholestérol exclusivement dans les hépatocytes. Les AB sont stockés dans la vésicule biliaire et activement déversés dans la lumière de l'intestin grêle après l'ingestion d'un repas. Initialement, les AB ont été décrits ayant comme fonction principale de faciliter la formation de micelles, ce qui favorise l'absorption des graisses alimentaires et de vitamines liposolubles.

La conversion du cholestérol en acides biliaires primaires (acide cholique et chénodésoxycholique) nécessite 3 étapes :

1/ l'initiation qui correspond à l'hydroxylation du noyau stérol pour former des dérivés 7alpha hydroxylés du cholestérol

2/ des modifications supplémentaires de la structure du noyau stérol

3/ l'oxydation de la chaîne latérale

Deux voies peuvent catalyser ces différentes réactions : la voie classique (ou neutre) à l'aide de CYP7A1 et la voie alternative (ou acide). Ces deux voies se distinguent par l'ordre des réactions qui transforment le cholestérol en acides biliaires primaires et le site cellulaire où la première réaction a lieu. Les souris déficientes pour CYP7A1 présentent une forte incidence de létalité postnatale due à une défaillance du foie et une malabsorption des graisses et des vitamines (Ishibashi 1996).

Le transport des acides biliaires au travers de la membrane canaliculaire des hépatocytes se fait contre un gradient de concentration de facteur 100 à 1000; ainsi leur sécrétion dans le canalicule biliaire nécessite un transport actif. L'excrétion canaliculaire des acides biliaires se fait *via* des transporteurs dont la fonction est dépendante de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

BSEP (Bile Salt Export Pump) appartient à la famille des ABC transporteurs et constitue le principal transporteur des acides biliaires au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Chez l'homme, des mutations de BSEP sont associées à une faible sécrétion d'acides biliaires (< à 1% de la normale) et de sévères cholestases. Chez ces patients, l'accumulation d'acides biliaires dans le foie cause une toxicité sévère qui peut conduire très rapidement à une cirrhose et une déficience hépatique (Suchy 2006).

Constitutivement, l'organisme synthétise plusieurs types d'AB de structures différentes : l'acide cholique (CA) et l'acide chenodésoxycholique (CDCA) sont des AB primaires, qui sont transformés par les bactéries du tractus digestif respectivement en acide désoxycholique (DCA) et lithocholique (LCA), appelés AB secondaires. Les AB (primaires et secondaires) peuvent être conjugués à la glycine et à la taurine dans le foie. L'homéostasie des AB met en jeu l'axe entéro-hépatique. En effet, la majorité des AB sont réabsorbés au niveau de la partie finale de l'intestin grêle (98%) et retournent vers le foie via la veine porte, une partie mineure est éliminée dans les fèces (2%). La fraction des AB qui échappe à la captation hépatique est retrouvée dans la circulation sanguine par laquelle ils atteignent d'autres organes cibles (tissu adipeux, pancréas, …). Depuis peu, il a été montré que les AB sont bien plus que de simples molécules détergentes, mais exercent des effets pléiotropiques potentiellement importants dans la régulation du métabolisme glucidique, lipidique et énergétique, agissant en tant que molécules de transduction du signal intracellulaire. En effet, la plupart de ces AB sont des ligands endogènes du récepteur nucléaire FXR (Fang 2015 ; Gioiello 2014) ou du récepteur membranaire couplé aux protéines G trimériques, TGR5 (Keitel 2011). Les différents types d'AB lient et activent FXR et TGR5 avec des puissances et des efficacités différentes, contribuant ainsi à la régulation de l'homéostasie métabolique. Ainsi, toute modification qualitative et / ou quantitative du pool d'AB - donc des ligands des récepteurs FXR et TGR5 - conduit potentiellement à des modifications de l'homéostasie glucidique et énergétique. Différentes études ont montré le rôle crucial de FXR hépatique dans le contrôle du métabolisme

glucidique et lipidique (Cariou 2006 ; Sepe 2015). Cependant, des études plus récentes ont aussi montré l'importance de FXR dans les tissus périphériques, notamment l'intestin, dans ce même contrôle (Fang 2015).

5.2. Les acides biliaires et le métabolisme lipidique

Depuis de nombreuses années, la relation entre les acides biliaires et le métabolisme du cholestérol est connue. Elle constitue une cible thérapeutique dans le traitement des dyslipidémies. Une approche utilisée concerne l'utilisation de résines chélatrices d'acides biliaires. Ces dernières séquestrent les acides biliaires dans la lumière intestinale ce qui empêche leur réabsorption et entraine leur excrétion dans les fèces. Cette perte est compensée par une synthèse hépatique *de novo* d'acides biliaires créant une importante mobilisation du stock de cholestérol. On observe alors chez les patients sous résines chélatrices une diminution de la concentration plasmatique de cholestérol et des LDL (Brinton 2016). Par ailleurs, ces patients présentent également une augmentation du taux circulant de triglycérides suggérant un rôle des acides biliaires dans la régulation du métabolisme lipidique au sens plus large (Insull 2006). En accord avec cette hypothèse, les patients traités aux acides biliaires présentent une diminution des triglycérides plasmatiques (Bell 1973; Angelin 1986). De la même manière, un traitement à l'acide cholique chez les souris hypertriglycéridémiques diminue le taux circulant de triglycérides et des VLDL (Watanabe 2004). Face à ces observations, plusieurs équipes se sont intéressées à l'implication des récepteurs des acides biliaires dans la régulation du métabolisme lipidique.

5.3. Farnesoid X receptor (FXR) et TGR 5

FXR est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes du métabolisme lipidique, glucidique et énergétique. Les mécanismes moléculaires sous-jacents de FXR sont multiples et associent notamment une diminution de la lipogenèse *de novo,* de l'absorption intestinale de cholestérol et de la production hépatique de VLDL, avec en parallèle une augmentation de l'adipogenèse dans le tissu adipeux blanc (Porez 2012).

FXR est fortement exprimé dans le foie et l'intestin, *i.e.* les sites majeurs du métabolisme des acides biliaires, et dans une plus faible mesure dans le tissu adipeux, le pancréas et les glandes surrénales. Parmi les acides biliaires, l'acide chénodéoxycholique est l'agoniste le plus puissant de FXR suivi par l'acide déoxycholique (Lefebvre 2009). Des études ont montré que les souris invalidées pour le gène *Fxr* présentent une augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides et de cholestérol ainsi que du stockage hépatique de lipides sous régime standard (Sinal 2000; Ma 2006). Ces souris présentaient en effet une diminution de l'excrétion fécale d'acides biliaires ainsi qu'une augmentation de leur taux circulant. Ces observations ont été corrélées à une diminution de l'expression du transporteur BSEP, impliqué dans l'export des acides biliaires dans les canalicules biliaires. De plus, chez des souris témoins, la supplémentation en acide cholique dans la nourriture induit l'expression de BSEP et réprime celle du transporteur NTCP qui est impliqué dans la réabsorption hépatique des acides biliaires. Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris déficientes pour FXR ce qui suggère un rôle causal de ce récepteur nucléaire dans la régulation par les acides biliaires de l'expression des transporteurs clés du cycle entérohépatique (Sinal 2000). A l'inverse, l'administration de GW4064, un agoniste pharmacologique spécifique de FXR, réduit l'hypertriglycéridémie chez les souris génétiquement obèses et diabétiques (ob/ob et db/db) (Cariou 2006; Zhang 2006). Par ailleurs, une étude a montré que l'administration d'acide taurocholique ne diminue pas les taux circulants de triglycérides chez les souris invalidées pour

le gène *Fxr*, ce qui suggère un rôle essentiel de ce récepteur dans la régulation du métabolisme lipidique par les acides biliaires (Claudel 2003). Une étude a récente a renforcé le rôle de FXR dans son rôle dans la voie RCT grâce à un agoniste acide obeticholique (OCA) qui inhibe l'absorption intestinale et modifie le pool d'acides biliaires (Xu 2016).

Des études ont également suggéré un rôle de TGR5 (ou GPBAR1 – G protein-coupled bile acid receptor 1) dans la régulation du métabolisme lipidique. En accord avec leur rôle de molécules de signalisation, les acides biliaires ont été identifiés comme ligands endogènes du récepteur membranaire TGR5 au début des années 2000. TGR5 fait partie de la super famille des récepteurs couplés aux protéines G et présente une affinité plus forte pour les acides biliaires secondaires (Kawamata 2003; Maruyama 2002). Il est fortement exprimé dans la vésicule biliaire, l'iléon et le côlon mais aussi dans les tissus adipeux blanc et brun, les muscles squelettiques, le pancréas, les cellules immunitaires et dans certaines aires cérébrales. D'un point de vue mécanistique, la fixation des acides biliaires sur TGR5 entraine l'activation de l'adénylate cyclase qui stimule la production d'AMPc. Ce dernier peut ensuite activer la protéine kinase A puis le facteur de transcription CREB, impliqué dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme glucidique et énergétique (Thomas 2008). Une équipe a notamment montré que l'administration d'un agoniste pharmacologique spécifique de TGR5 diminue le taux de triglycérides circulants et la stéatose hépatique chez les souris rendues obèses par un régime hypercalorique (Thomas 2009). Ces données sont cependant nuancées par l'étude du phénotype des souris invalidées pour le gène *Tgr5*. En effet, ces souris ne présentent de modification ni de leur masse corporelle ni de leur taux circulant de triglycérides sous régime standard. De plus, sous régime hypercalorique, l'invalidation de TGR5 entraine une augmentation de la masse grasse mais uniquement chez les souris femelle (Vassileva 2010).

Depuis quelques années avec notamment les avancées en recherche en chirurgie bariatrique, TGR5 est devenu une cible thérapeutique dans le but de traiter les dyslidémies, le

diabète de type 2, l'obésité, le cancer… (Hodge 2016). Pour le moment les études animales avec l'agoniste montrent de nombreux effets secondaires (nausées, vomissements, constipation, risque de pancréatite, vascularite,…). Dans cette étude, seuls les effets notamment sur le pancréas ont été étudiés (Perrides 2010).

5.4. Les acides biliaires et la chirurgie bariatrique

Toutes les chirurgies bariatriques ne modifient pas le flux biliaire de manière identique. Les chirurgies malasorptives (RYGBP, mini bypass, biliodiversion,…) entrainent une modification du trajet des acides biliaires et, par conséquent, de la biodisponibilité et de la composition des ceux-ci dans l'intestin. En fonction des espèces animales ou de l'homme, la modification de la composition des acides biliaires dans le plasma est différente après RYGBP (Spinelli 2016). Une étude récente a mise en évidence chez le rat, une même modification du profil des acides biliaires en faveur de la forme conjuguée taurine que ce soit après sleeve ou biliodiversion (Wu 2016). En effet : l'anse alimentaire est complètement dépourvue de bile et seuls la bile, les sucs pancréatiques et les sécrétions gastriques transitent dans l'anse biliopancréatique. Ainsi, les acides biliaires sont sous forme libre, non complexés avec les lipides alimentaires, dans cette anse. Puis ils arrivent sous forme libre dans l'anse commune.

De nombreuses études ont démontré que le by-pass gastrique Roux-en-Y provoque une augmentation de la concentration plasmatique d'acides biliaires (Patti 2009; Simonen 2012). Patti et al ont en effet démontré que les patients ayant bénéficié d'un RYGBP ont un taux d'acide biliaire sérique 2 fois supérieur aux groupes contrôles et que ces taux étaient inversement corrélés à la glycémie post-prandiale, aux TG et à la TSH, alors que positivement corrélés à l'adiponectine et au GLP1 post-prandial (Patti 2009). Mais ces effets ne se limitent pas aux chirurgies malabsorptives, puisqu'après une sleeve gastrectomie il existe également

une modification de ce flux (Wu 2016, Belgaumkar 2016), probalement dû à un effet métabolique hépatique de la sleeve (Ryan 2014).

De par les effets bénéfiques des acides biliaires sur le métabolisme glucidique (Parker 2012), il a été suggéré que la perturbation du métabolisme des acides biliaires pourrait être à l'origine des effets rapides sur le diabète observés après certaines chirurgies de l'obésité. Une étude très récente s'est intéressée à l'implication de FXR dans les effets rapides sur le métabolisme glucidique des chirurgies de l'obésité. Elle a notamment démontré que les effets bénéfiques sur le métabolisme glucidique et énergétique de la sleeve gastrectomie sont annulés chez les souris invalidées pour le gène *Fxr* (Ryan 2014). Cette étude place les acides biliaires au niveau de régulateurs possibles des effets spectaculaires des chirurgies bariatriques sur le contrôle glucidique mais aussi à degré moindre lipidique (Penney 2015). En accord avec cette hypothèse, l'augmentation du taux d'acides biliaires circulants est retrouvée après interposition iléale et sleeve gastrectomie mais pas après anneau gastrique (Kohli 2010; Mencarelli 2013; Stefater 2011; Myronovych 2014; Kohli 2013; Pournaras 2012).

L'émulation autour des acides biliaires est en marche avec de nombreuses études en cours. A la clé de ces nombreux travaux se trouve de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des troubles glucido-lipidiques.

Objectif de mon travail

L'objectif de mon projet de thèse a été de :

1/ Mettre en place au sein du laboratoire, les 2 modèles murin de chirurgie bariatrique : la sleeve gastrectomie et le Roux en Y Gastric Bypass

2/ D'étudier la modification ou non des fonctions digestives à 2 semaines et 4 semaines postopératoires après sleeve gastrectomie, dans un modèle murin. Pour cela, 3 groupes de souris ont été réalisés après au préalable 8 semaines de régimes high fat bien conduit : un groupe sham, un groupe pair fed et un groupe sleeve gastrectomie. Nous avons étudié par la suite ex vivo la perméabilité para et transcellulaire ainsi que le temps de transit total, puis à 4 semaines, nous avons étudié ex vivo, la perméabilité para et transcellulaire et réaliser des qPCR pour étudier les marqueurs d'inflammation à l'aide de cytokines inflammatoires dans le tube digestif et le tissu adipeux. Enfin, nous avons dosé par sphectrométrie de masse, le LPS dans la circulation sanguine à 4 semaines.

3/ Comprendre les conséquences de la gastrectomie de type sleeve et du bypass Roux-en-Y modifié sur le métabolisme du cholestérol dans un modèle murin. Les souris C57Bl6 du protocole Sleeve gatrectomie (SG) ont reçu, dès l'âge de 10 semaines, un régime riche en graisse pendant 8 semaines. Les souris du groupe « by-pass » (RYGBP) ont été nourries avec le même régime mais ont reçu en plus du fructose dans leur eau de boisson (20% W/V) afin de favoriser la prise de poids. A l'issu de ces 8 semaines, les souris SG ont été randomisées sur la base de leur poids et de leur cholestérolémie : 1) groupe Sham, 2) groupe Sham Pair-fed, 3) groupe SG. Les souris RYGBP ont été également randomisées en fonction de leur poids et de leur cholestérolémie et séparées en 2 groupes d'étude : 1) groupe Sham, 2) groupe RYGBP et 3/ groupe Pair-fed. Par la suite, nous avons déterminé les conséquences sur le métabolisme du cholestérol de ces chirurgies en mesurant les niveaux plasmatiques de

cholestérol et les effets sur l'absorption intestinale de cholestérol, le cycle entérohépatique des acides biliaires et l'excrétion trans-intestinale de cholestérol. Nos résultats permettront de déterminer l'impact des chirurgies bariatriques sur les voies intestinales impliquées dans la régulation du métabolisme de cholestérol et de mieux comprendre les effets hypolipémiants observés après chirurgies.

Tous ces résultats vont être détaillés à l'aide de 3 articles originaux : le premier portant sur la technique opératoire, sous presse dans JOVE (IF 1.1), le 2ème portant sur l'impact à court terme de la sleeve gastrectomie sur la perméabilité intestinale accepté en communication orale au congrès américain Obesity Week (novembre 2016) et soumis dans SOARD (Surgery for Obesity and Related Diseases IF 4.94) et le 3ème portant sur les conséquences de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol qui sera soumis dans eLIFE (IF 9.32).

Les articles originaux

Article 1. Techniques of Sleeve Gastrectomy and modified Roux En-Y Gastric Bypass in mice. Accepted in Jove (IF 1.1)

Article 2. Sleeve gastrectomy alters intestinal permeability in diet-induced obese mice. Revision in SOARD (Soumission Surgery Obesity Research Disease IF 4.92)

Article 3. Effects of bariatric surgeries on cholesterol metabolism in mice (Soumission eLife IF 9.32)

Review 1. L'excrétion transintestinale du cholesterol (TICE). Une nouvelle voie d'épuration du cholestérol plasmatique. Médecine et Sciences. (IF 0.53)

Article 1

Afin de pouvoir étudier l'effet de la chirurgie bariatrique sur la modification ou non de la perméabilité para et transcellulaire mais aussi sur l'impact de celle-ci sur le métabolisme du cholestérol et plus précisement le TICE, nous avons mis en place au sein de l'unité, 2 modèles chirurgicaux de chirurgie bariatrique chez la souris : la sleeve gastrectomie et le Roux-en-Y Gastric bypass modifié. Dans cet article, accepté dans Jove sous forme de vidéo, les différents modèles sont détaillés ainsi que toute la prise en charge périopératoire, indispensable à la survie des animaux. Nous avons constaté une amélioration de notre taux de survie avec la pratique de cette chirurgie. Outre l'amélioration de la technique chirurgicale qui a permis de réduire la mortalité précoce du RYGBP, la supplémentation en fer et en vitamines tout au long du protocole a permis de diminuer la mortalité tardive et d'améliorer la tolérance des souris à la chirurgie. Nous avons observé une perte de poids après chirurgie bariatrique, dont la cinétique reproduisait celle observée chez l'homme : perte de poids initiale, plus importante après RYGBP qu'après SG, suivie d'un regain pondéral modéré. Nous avons également observé une amélioration du métabolisme glucidique, avec une diminution de l'insulinorésistance après oGTT, plus important après le RYGBP vs la Sleeve Gastrectomie. Nos protocoles opératoires sont donc des protocoles aboutis et reproductibles, mais qui nécessitent, notamment pour le RYGBP, un entraînement conséquent (cutoff de 50 souris).

TITLE:
Techniques of Sleeve Gastrectomy and modified Roux En-Y Gastric Bypass in mice

AUTHORS:
Audrey Ayer[1], Frederic Borel[1], François Moreau[1, 2], Xavier Prieur[1, 2], Michel Neunlist[3, 4], Bertrand Cariou[1, 2, 5], Claire Blanchard[1, 6]*, Cedric Le May[1]*.
*Equally contributed

AFFILIATION:
Ayer, Audrey
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Nantes, France
Audrey.Ayer@univ-nantes.fr

Borel, Frederic
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Nantes, France
frederic.j.borel@gmail.com

Moreau, François
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Nantes, France
francois.moreau3@etu.univ-nantes.fr

Prieur, Xavier
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Université de Nantes,
Nantes, France
xavier.prieur@univ-nantes.fr

Neunlist, Michel
INSERM U913
CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif
Nantes, France
michel.neunlist@univ-nantes.fr

Cariou, Bertrand
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Department of Endocrinology, CHU de Nantes
Université de Nantes
Nantes, France,
bertrand.cariou@univ-nantes.fr

Blanchard, Claire
l'Institut du Thorax

INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Service de Clinique Chirurgicale Digestive et Endocrinienne, CHU de Nantes
Nantes, France,
Claire.blanchard@chu-nantes.fr

Le May, Cedric
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Nantes, France
Cedric.lemay@univ-nantes.fr

CORRESPONDING AUTHOR:
Le May, Cedric
l'Institut du Thorax
INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291
Nantes, France
Cedric.lemay@univ-nantes.fr
cedric.lemay@univ-nantes.fr

KEYWORDS:
Bariatric surgery; Sleeve gastrectomy; Roux en Y Gastric By-pass; Obesity; Mouse

SHORT ABSTRACT:
Bariatric surgery is the most efficient way to reduce body weight and deadly metabolic complications (diabetes, obesity & dyslipidemia) frequently associated to obesity. Mouse models of bariatric surgery represent a unique asset to decipher the molecular mechanisms behind the beneficial effects of these surgeries on diabetes, hypertension and dyslipidemia.

LONG ABSTRACT:
Obesity is a major public health issue, with a prevalence of 4 to 28 % for men and 6.2 to 36.5 % for women in Europe (from 2003 till 2008). Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia, reducing the expectancy and the quality of life. In absence of any effective noninvasive treatments, bariatric surgery represents a valuable therapeutic option for patients with morbid obesity (BMI (Body mass index) > 40 kgs/m^2), leading to long term sustained weight loss and improvement of metabolic complications. However, the cellular and molecular mechanisms sustaining these improvements are not yet fully understood. Due to the numerous genetically modified strains available, mouse is the most convenient animal model to explore the molecular mechanisms behind the pleiotropic beneficial effect of bariatric surgeries. Here, we detailed optimized healthcare methods and surgical protocols to perform the two most popular bariatric surgeries in mice: the Sleeve Gastrectomy and the modified Roux en Y Gastric Bypass. Deciphering the molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of bariatric surgeries offers the promise of identifying new therapeutics targets.

INTRODUCTION:
The worldwide pandemic of obesity and diabetes is devastating in severity. Over two billion adults worldwide (30% of the population) are either overweight (Body Mass Index (BMI) > 25 kgs/m^2) or obese (> 30 kgs/m^2)[1]. This one can come along with metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia, leading to increased morbid-mortality. Obesity increases the overall mortality and the prevalence of cancers[2]. Due to the lack of any effective noninvasive treatments, bariatric surgery represents the only option that can lead to long-term sustained weight loss[3,4]. A number of different surgical methods have been developed but sleeve gastrectomy (SG) and Roux en Y gastric bypass (RYGB) are the two procedures most commonly used in clinical practice. During the SG procedure, 80% of the initial volume of the stomach is removed; this technique belongs to the restrictive surgeries that improve satiety. The RYGB is one of the “malabsorptive” techniques. During RYGB, a small gastric pouch (1-2% of total gastric volume) is created and the intestine is rearranged in a Y-shaped anatomy that promotes a delay of digestion and absorption of nutrients. These two techniques lead to significant body weight reduction and general improvement of frequently associated comorbidities (high blood pressure, diabetes & dyslipidemia…)[3]with higher efficiency for RYGB. However, molecular mechanisms behind the pleiotropic beneficial effects of bariatric surgeries are often not fully elucidated. Due to the numerous genetically modified strains available, mouse is the most convenient animal model to explore these molecular mechanisms.

However, these procedures are often difficult to directly adapt in small animal models and require high surgical dexterity. If SG could be easily transposed in rodents with a very good survival rate, RYGB is lethal in mice due to severe bowel obstruction[5]. Different modified RYGB techniques have been proposed to counteract this problem,

notably the oesojejunostomy[5]. Here, we present another alternative: the gastrojejunostomy without stomach excision. This modified RYGB reproduces most of the beneficial effects observed in humans *i.e.* a significant body weight reduction and an improvement of glucose and lipid homeostasis.

This manuscript aims to summarize and discuss technical and experimental details of SG and RYGB in mice. The purpose of this article is to facilitate this procedure with the help of the video. A specific highlight will be made regarding the optimization of the preoperative and postoperative healthcare protocols that allow reducing vitamin and iron deficiency.

PROTOCOL:

Animal and housing: Obtain8 weeks old C57Bl/6 male mice.. 10 weeks old C57Bl/6 mice had free access to water and high fat diet (DIO diet 35%kcal from fat, caseine 25.8%, mineral AIN 1.30%, vitamins 1.30%, phosphate bicalcique 1.70%, calcium carbonate 0.7%, citrate potassium 2.10%, choline bitartrate 0.026%, sucrose 8.9%, cystine 0.384%, cellulose 6.5%, lard 31.7%, soybean oil 3.3%, maltodextrine 16.29%) for 8 (SG) or 14 weeks (RYGB) prior bariatric surgeries. To favor the weight gain, mice dedicated to the RYGB surgery (Sham & RYGB) received in addition to the high fat diet water containing 20% fructose (w/v).

All protocol steps described below follow the guidelines of the Ethic Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire and receive the approval number 01953.01.

1. **General preoperative preparation**

   1.1. Fast mice 6 hours before surgery. Induce anesthesia in chamber with 5% isoflurane, air flow of 0.4 L/min and O2 (dioxygen) flow 0.4 L/min. Perform toe pinch test to confirm that anesthetization is effective. Administer analgesics (buprenorphine 0.1 mg/kg), antibiotics (marbofloxacine 10 mg/kg) and pro-kinetics (metoclopramide 1 mg/kg) via subcutaneous injections.

   1.2. Allocate a specific work area for surgical procedures (distant from laboratory traffic and ventilation fans). Clean the surgical area with dedicated hard surface disinfectants. Place on the working space area a heatpad to maintain mouse homeothermy during surgery. Apply a clean paper over the heatpad.

   1.3. Shave the abdomen from sternum to pelvis using electric razor. Wrap the mouse abdomen in plastic wrap and place the mouse in supine position on the heatpad.

   1.4. Apply vet ointment on eyes to prevent dryness while under anesthesia. Place the mouse in the nosecone and maintain anesthesia with 2% isoflurane, air flow of 0.4 L/min and O2 (dioxygen) flow of 0.4 L/min.

   1.5. Before beginning surgery, wear a sterile examination gown; a disposable scrubs cap, a facemask and sterile gloves. Open an autoclaved-pack containing a sterilized surgical instrument set required

for all steps of the surgery. Cut a window in the plastic wrap and disinfect the skin with 2 successive povidone-iodine solution .

2. Sleeve gastrectomy: surgical procedure

2.1. Median laparotomy.

2.1.1. Under binocular microscope perform a midline incision from sternum to middle of the abdomen with a scalpel to open abdominal cavity (being careful not to damage the abdominal muscles). Protect the skin with a sterile compress soaked with 37°C saline solution.

2.2. Stomach exposure

2.2.1. Gently mobilize the stomach using moistened cotton swabs. Free the stomach from its lateral close connective tissue attachments using moistened cotton swabs or micro scissors.

2.2.2. Gently fully externalize the stomach placing resorbable hemostatic collagen compress behind the stomach. Suture the pylorus vessels along the stomach greater curvature with 8.0 non-absorbable single sutures to avoid future bleeding.

2.3. Resection of the cardiac region of stomach (fundus)

2.3.1. Perform a gastrotomy on the anatomical line present between pyloric region (corpus) and the cardiac region of stomach (fundus).

2.3.2. Complete gastric emptying with 2 moistened cotton swabs towards each side of the stomach. Cutting with micro scissors the stomach along the boundary between the fundus and the corpus of the stomach.

2.3.3. Press a resorbable hemostatic collagen compress 2 min in case of major bleeding. Suture the incision site with 8.0 non-absorbable running suture from the gastro-oesophagal junction. Do not stop the suture until the complete stomach suture to the end of the incision.

2.4. Resection of the pyloric region of stomach (corpus)

2.4.1. Complete stomach resection along the greater curvature so as to remove approximately 80% of the stomach. Press a resorbable hemostatic collagen compress 2 min in case of major bleeding.

2.4.2. Continue the 8.0 non-absorbable running suture to the end of the incision. Gently roll 2 moistened cotton swabs towards each side of the stomach to ensure the suture is leakproof. The width of the SG is standardized to 3mm.

2.4.3. Complete with 8.0 non-absorbable interrupted sutures in case of leakage. Remove the hemostatic collagen compresses and return

the stomach in the abdominal cavity. Leave a hemostatic collagen compress against the suture.

2.5. Abdominal closure

2.5.1. Close muscle layer of abdominal wall using 5.0 non-absorbable running suture. Reduce anaesthesia by reducing isoflurane concentration to 1%. Close the skin using 5.0 non-absorbable interrupted sutures

3. Roux-en-Y gastric bypass: surgical procedure

3.1. Median laparotomy

3.1.1. Perform under binocular microscope a midline incision from sternum to middle of the abdomen with a scalpel to open abdominal cavity (being careful not to damage the abdominal muscles). Protect the skin with a sterile compress soaked with 37°C saline solution.

3.2. Biliopancreatic limb and alimentary limb

3.2.1. Identify the first small bowel loop (at the ligament of Treitz). Externalize the intestine. Measure 4 cm from the end of the duodenum. Perform two ligatures of the intestine with a 5.0 non-absorbable suture.

3.2.2. Transect the intestine between the two ligatures. Place proximal stump of the two ends in the left upper quadrant of the abdomen. Note: This will be used as the alimentary limb.

3.2.3. Place the distal stump of the two ends facing the alimentary limb 6 cm below the proximal stump.

Note: This will be used as the biliary limb.

3.3. Jejuno-jejunostomy

3.3.1. Transect using micro scissors both proximal stump and intestine loop using micro scissors to perform two antimesenteric incisions of the same length.

3.3.2. Perform side-to-side anastomosis with two 8.0 non-absorbable running sutures. First perform the dorsal side anastomosis and then the ventral side anastomosis.

3.3.3. Gently roll 2 moistened cotton swabs towards each side of the anastomosis to ensure the suture is leak-proof. Complete with 8.0 non-absorbable interrupted sutures in case of leakage.

3.4. Gastro-jejunostomy

3.4.1. Gently mobilize the stomach using moistened cotton swabs. Free the stomach from its lateral close connective tissue attachments using moistened cotton swabs or micro scissors.

3.4.2. Gently fully externalize the stomach placing re-absorbable hemostatic collagen compress behind the stomach. Perform a

ligature of the Pylorus using a 5.0 non-absorbable suture passed through the omentum with curved micro forceps.

3.4.3. Transect both ventral side of stomach at 1.5 cm of the pylorus and distal stump using micro scissors to perform two incisions of the same length.

3.4.4. Perform side-to-side anastomosis with two 8.0 non-absorbable running sutures. First begin the dorsal side anastomosis and then the ventral side anastomosis. Gently roll 2 moistened cotton swabs towards each side of the anastomosis to ensure the suture is leak-proof. Complete with 8.0 non-absorbable interrupted sutures in case of leakage.

3.5. Abdominal closure

3.5.1. Close muscle layer of abdominal wall using 5.0 non-absorbable running suture. Reduce anesthesia by reducing isoflurane concentration to 1%. Close the skin using 5.0 non-absorbable interrupted sutures. Administer 25 mL/kg of warm saline solution via subcutaneous injection.

4. General postoperative care

4.1. Stop isoflurane and continue with O2 (dioxygen) flow of 0.8 L/min until the mouse is fully awake. Do not leave the mouse unattended until it regains motor control indicated by the animal starting to move around the cage and being able to stand and walk without falling.

4.2. Place only one mouse in a cage in an incubator under 30°C temperature condition during 5 days.

4.3. Maintain iron (0.5mg/kg/day; subcutaneous injection) and vitamin (800 mg/180 mL in water) supplementations in RYGB mouse until the end of the protocol.

4.4. Give back free access to gel diet food (Gel diet High fat, lard 10%, liquid sugar 10%, water 57%) for 5 day after surgery. Reintroduce solid diet 3 days after surgery.

4.5. Inject subcutaneously buprenorphine (0.1 mg/kg, twice daily, from day 0 to day 3 after surgery), meloxicam (1 mg/kg, from day 0 to day 3 after surgery), metoclopramide (1 mg/kg, from day 0 to day 5 after surgery) and marbofloxacine (10 mg/kg, from day 0 to day 3 after surgery).

5. Postoperative metabolic parameters assessment

5.1. Food intake measurement

5.1.1. Allow the mice to recover 1 week after surgery. Only one mice in cage. Measure the amount of solid diet placed in the cage. Weight the remaining food 24 hours after. Repeat the steps as long as required.

5.2. Oral glucose tolerance test

5.2.1. Fast the mice 6 hours before the oral bolus. Harvest a blood drop from the tail tip and apply it on a glucose strip inserted in a glucometer to determine the time 0 blood glucose value.

5.2.2. Administer an oral bolus of 20% D-glucose solution (2 g/Kg). Measure blood glucose levels at 15, 30, 60 and 120 minutes post gavage.

5.3. Hemoglobin level analysis

5.3.1. Measure with 20 µl of fresh blood sample the hemoglobin level using a Hematology system

6. Euthanasia

6.1. Anesthetize the mice by injecting intraperitoneally a xylazine/ketamine solution (10/80 mg/kg). Perform cervical dislocation. Verify the complete euthanasia by ensuring that the heart is not beating and the eyeball blink reflex is lost.

REPRESENTATIVE RESULTS:

General conditions

Mean operative time for SG procedure was 49.33 ± 1.5 min. We removed 62.85 ± 5.05 mg of stomach that represents about 80% percent of the stomach. No mice died during or the seven days following the surgery (*figure 1*). One mouse (7.1%) died on the eleventh postoperative day because of a gastric obstruction caused by a bezoar.

Mean operative time for RYGB procedure was 89.1 ± 2.8 min. The mortality rate was significantly higher after RYGB (Sham 25% vs RYGB 66.6%, p=0.038). Main causes of postoperative deaths were anastomotic leaks (n=8), anastomotic stenosis (n=5), anesthesia complications (n=4) and postoperative bleeding (n=2). We also experimented two long-term deaths due to gastro-intestinal anastomosis stenosis with chronic obstruction and malnutrition. As shown in Figure 1, we noticed a progressive improvement of the post-operative survival rate all along the protocol indicating that an intensive surgical training is required for mastering the RYGB surgical technique.

Body weight, food intake & glucose homeostasis

Mice had similar body weight before surgery. SG had significant weight loss 14 days after surgery compared to sham control mice (Sham -6.6% vs SG -16%, $p<0.01$, Figure 2A). RYGB was associated with significant weight loss from postoperative days 14 (Sham -7.9% at day 14 post-surgery, -5.1% at day 28 post-surgery vs RYGB -22.9% at day 14 post-surgery, -25.5% at day 28 post-surgery, Figure 2B). Daily food intake was reduced by 35% during the 14 days period following the SG (Figure 2C). By contrast we did not observe such anorexigenic effect between sham and RYGB mice (Figure 2D). We also reported an improvement of glucose tolerance following SG & RYGB surgeries (Figure 2E, 2F).

Beneficial effect of iron supplementation on RYGB induced Anemia

We did not observesignificant decrease of hemoglobinemia 14 days after SG surgery (Data not shown). By contrast, severe anemia was measured in RYGB operated mice that did benefit from specific iron supplementation (Figure 3A). Daily iron

supplementation was indeed crucial and avoided significant anemia 28 days after RYGB surgery (Figure 3B).

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Survival rate of mice 7 days after RYGB surgery. Data show the benefit of surgical training on the survival rate of RYGB operated mice. Values are shown as mean value ± SEM.

Figure 2: Effect of SG (A, C, D) and RYGB (B, D, F) on body weight, daily food intake and glucose tolerance. Data are shown as mean value ± SEM. NS: not significant; * P<0.05; ** P<0.01. (Mann-Whitney test, Anova test)

Figure 3: Plasma hemoglobin levels after RYGB in mice without (A) or with iron supplementation (B). Data are shown as mean value ± SEM. NS: not significant; * P<0.05. (Mann-Whitney test)

DISCUSSION

To overcome the growing epidemic of obesity, first bariatric surgery procedures have emerged in the 1960s in the United States. Since then, the number of procedures performed each year worlwide still increase and these techniques represent today the best therapeutical option in the management of obesity[6]. Among the procedures developed, SG & RYGB are the two most popular methods used in clinical practice[4]. Animal models, notably rodents, have been used to decipher the mechanisms behind the general health improvement observed after bariatric surgery.

We developed two mouse models of bariatric surgery: one restrictive (SG) and one malabsorptive (RYGB) surgery, in order to decipher the molecular mechanisms sustaining the improvement of metabolic parameters. The realization of these mouse bariatric procedures requires an experience in microsurgery. These models have been developed using a technician specialized in animal surgery and a human visceral surgeon. From experience, surgical training was necessary to reach over 75% survival after RYGB. Mastering SG does not require as much time, and the learning curve is shorter with mortality about 95%. Due to the fact that RYGB is a more complex technique, with a period twice a long..

In the literature, there are a variety of rodent bariatric procedures that have been previously described[7, 8, 9]. In this SG technique, we removed the cardiac region of the stomach (also called fundus), not present in humans. The objective was to remove about 80% of the stomach. The pouch size of RYGB models in rats ranges from <5% to > 20% of the initial stomach size. Many mouse models show a large gastric pouch size variability, from complete conservation of stomach[10] to no pouch at all[5]. For the RYGB procedure, we decided to realize a roux-en-y without cutting the stomach.

Survival rate after RYGB operations in rats is rarely mentioned by the authors in the literature, but seems to reach about 30 to 35% in average[11]. In our hands, mortality was mainly due to anastomotic leakage or stenosis, or in late postoperative with gastrojejunal anastomosis stenosis leading to chronic obstruction with persistent excessive weight loss leading to compromised animal welfare. RYGB requires a specific perioperative management, with a gelified diet during the first three postoperative days, and with the pain management. To improve long-term survival after surgery, we added vitamins postoperatively, particularly fat-soluble vitamins and iron, to prevent anemia. Conversely, mice do not need liposoluble vitamins

supplementation after SG, since it was only a restrictive procedure. In the previous papers, the authors did not describe the health condition of operated animals during the postoperative course. Because is a major surgery, we cannot conclude with the systematic well-being of the animals in these studies.

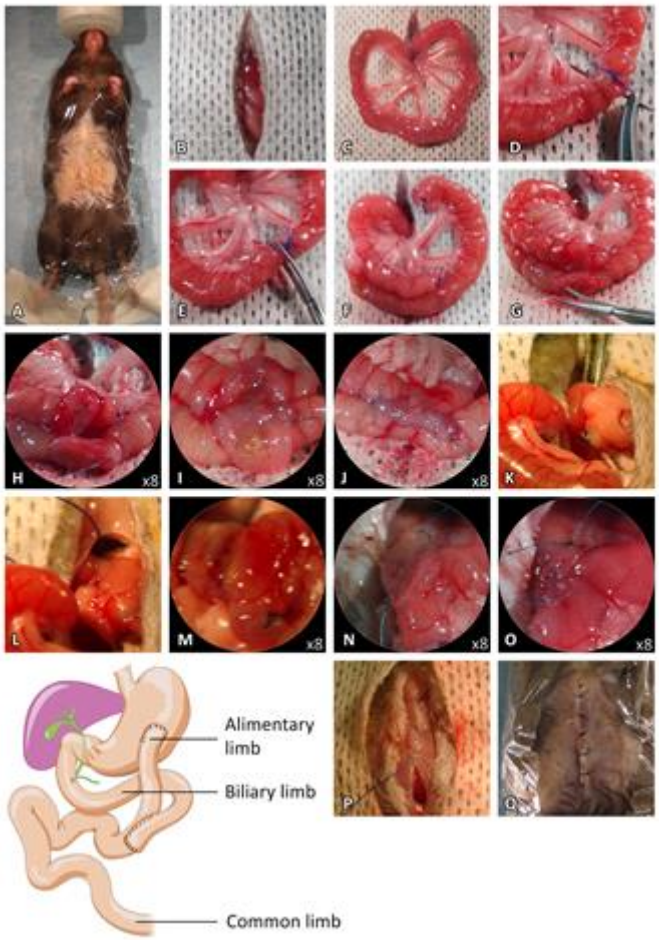
In conclusion, mouse models of either restrictive (SG) or malabsorptive (RYGB) bariatric sugeriesare feasible but require a microsurgical training with a learning curve, especially for RYGB procedure. The perioperative management is very important, particularly pain, but also of vitamin supplementation in the RYGB, for keeping animals in good health. These models are useful and essential tools to understand the metabolic effects of bariatric surgery. By achieving a faster, sterile surgery and with a microsurgical training, we can ameliorate the survey after surgery.

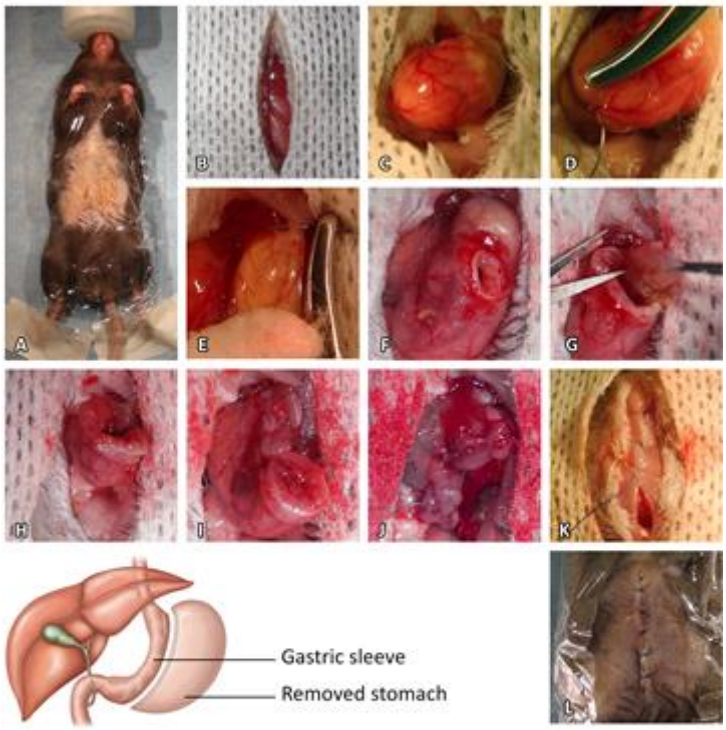
ACKNOWLEDGEMENTS:
We thank Gilles Mithieux and Aude Barataud (INSERM U1213, Lyon, France) and Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in the setting of the animals care protocol. This work was supported by grants from « La région des Pays de la Loire », the « fondation d'avenir » and the Casden bank.

DISCLOSURES:
No conflicts of interest declared

REFERENCES:
1. Ng, M., Fleming, T., *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet***384** (9945), 766–781, doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8 (2014).
2. Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C. & Heath, C. W. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine***341** (15), 1097–1105, doi:10.1056/NEJM199910073411501 (1999).
3. Sjöström, L., Lindroos, A.-K., *et al.* Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *The New England Journal of Medicine***351** (26), 2683–2693, doi:10.1056/NEJMoa035622 (2004).
4. Buchwald, H., Avidor, Y., *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA***292** (14), 1724–1737, doi:10.1001/jama.292.14.1724 (2004).
5. Yin, D. P., Gao, Q., *et al.*Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Annals of surgery***254** (1), 73–82, doi:10.1097/SLA.0b013e3182197035 (2011).
6. Buchwald, H. & Oien, D. M. Metabolic/Bariatric Surgery Worldwide 2008. *Obesity Surgery***19** (12), 1605–1611, doi:10.1007/s11695-009-0014-5 (2009).
7. Liu, W., Zassoko, R., *et al.* Establishment of duodenojejunal bypass surgery in mice: A model designed for diabetic research. *Microsurgery***28** (3), 197–202, doi:10.1002/micr.20454 (2008).
8. Lan, Z., Zassoko, R., *et al.* Development of techniques for gastrojejunal bypass surgery in obese mice. *Microsurgery* , NA-NA, doi:10.1002/micr.20746 (2010).
9. Schlager, A., Khalaileh, A., *et al.*A mouse model for sleeve gastrectomy: Applications for diabetes research. *Microsurgery***31** (1), 66–71, doi:10.1002/micr.20797 (2011).
10. Troy, S., Soty, M., *et al.* Intestinal Gluconeogenesis Is a Key Factor for Early

Metabolic Changes after Gastric Bypass but Not after Gastric Lap-Band in Mice. *Cell Metabolism***8** (3), 201–211, doi:10.1016/j.cmet.2008.08.008 (2008).
11. Seyfried, F., Lannoo, M., *et al.* Roux-en-Y gastric bypass in mice--surgical technique and characterisation. *Obesity surgery***22** (7), 1117–1125, doi:10.1007/s11695-012-0661-9 (2012).


A
B
C
D
E
F
G
H
x8
I
x8
J
x8
K
L
M
x8
N
x8
O
x8
P
Q
Alimentary limb
Biliary limb
Common limb


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
Gastric sleeve
Removed stomach

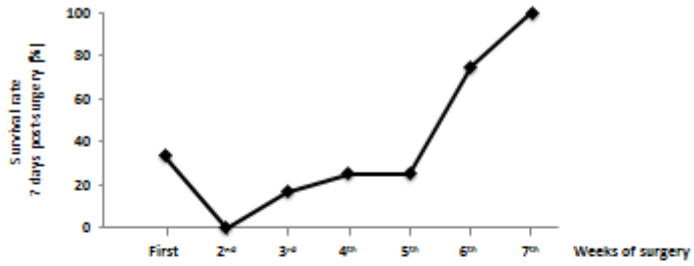

Survival rate
7 days post surgery [%]
100
80
60
40
20
0
First
2nd
3rd
4th
5th
6th
7th
Weeks of surgery

Figure 1

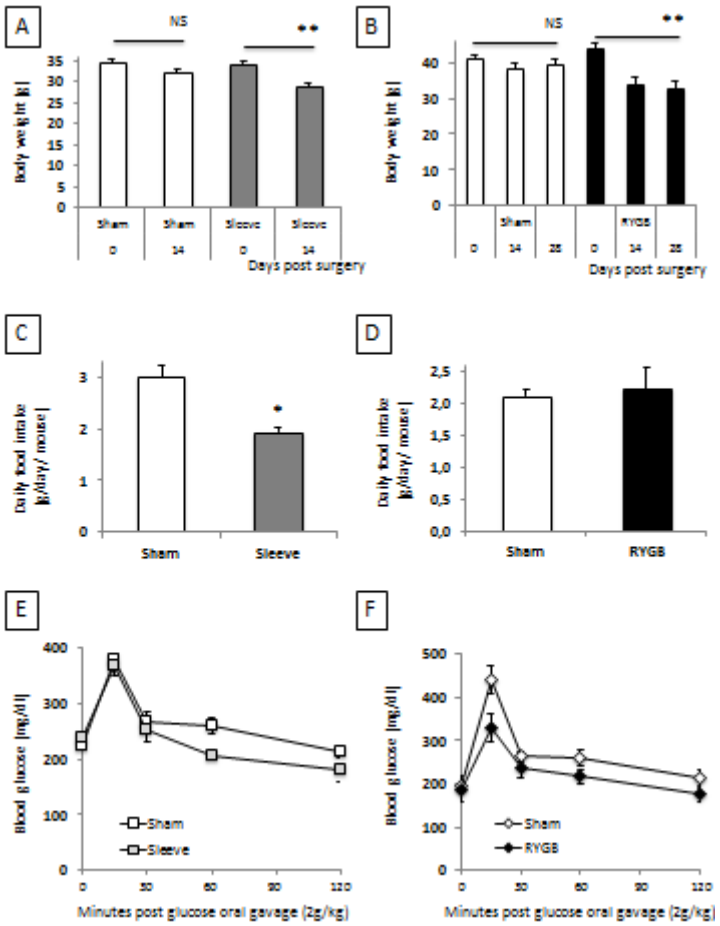

A
NS
**
Body weight [g]
Sham
Sham
Sleeve
Sleeve
0
14
0
14
Days post surgery
B
NS
**
Body weight [g]
Sham
RYGB
0
14
28
0
14
28
Days post surgery
C
*
Daily food intake [g/day/ mouse]
Sham
Sleeve
D
Daily food intake [g/day/ mouse]
Sham
RYGB
E
Blood glucose [mg/dl]
Sham
Sleeve
Minutes post glucose oral gavage (2g/kg)
F
Blood glucose [mg/dl]
Sham
RYGB
Minutes post glucose oral gavage (2g/kg)

Figure 2

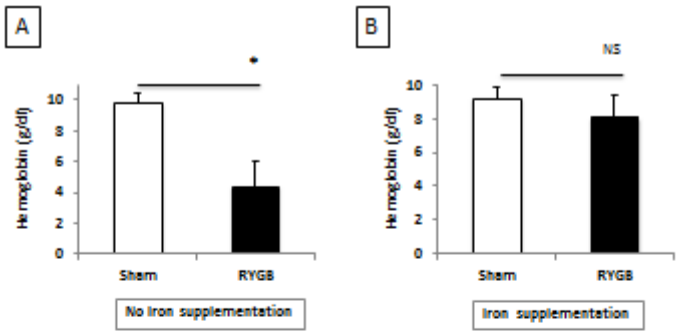

A
*
Hemoglobin (g/dl)
10
8
6
4
2
0
Sham
RYGB
No Iron supplementation
B
NS
Hemoglobin (g/dl)
10
8
6
4
2
0
Sham
RYGB
Iron supplementation

Figure 3

Article 2 :

L'obésité entraine une augmentation de l'inflammation avec une modification de la perméabilité. Différentes études animales mais aussi chez l'homme mettent en évidence après un régime high fat diet, une augmentation de la perméabilité et donc par conséquent une augmentation du passage du LPS au niveau de la barrière intestinale et donc de l'inflammation. L'effet de la chirurgie sur le renforcement ou non de la barrière intestinale avec notamment l'étude de la perméabilité a été peu étudié et seulement après RYGBP. L'effet de la sleeve gastrectomie n'a jamais été étudié. Nous avons donc étudié en collaboration avec l'INSERM U913 (Dr Neunlist), l'effet précoce de la sleeve gastrectomie sur la perméabilité para et transcellulaire aisni que la modification ou non de l'inflammation systémique.

Nos travaux mettent en évidence pour la première fois 4 semaines après une sleeve gastrectomie, une augmentation de la perméabilité para et transcellulaire ex vivo au niveau du colon, responsable d'une translocation du LPS entrainant une augmentation de l'inflammation au niveau du tissu adipeux inguinal. Malgré cette translocation et cet état pro inflammatoire, les souris opérées d'une SG, présentaient une amélioration de leurs paramètres glucidiques ainsi qu'une perte de poids, suggérant un effet bénéfique de cet état. Dans le futur, il serait intéressant d'étudier à la fois l'effet de cet état proinflammatoire sur d'autres tissus, notamment le foie, mais aussi de réaliser ces expériences sur les souris après RYGBP. Enfin, une étude à plus long terme permettrait de comprendre le retour à la normale voire une amélioration après chirurgie bariatrique de la perméabilité intestinale et de l'inflammation systémique, et de comprendre les mécanismes impliqués, notamment les modifications ou non de la barrière épithéliale intestinale.

Title: Sleeve gastrectomy alters intestinal permeability in diet-induced obese mice.

Running Title: Sleeve gastrectomy and intestinal barrier

Claire Blanchard, MD[1,3], François Moreau[1], Jean-Paul Pais de Barros, PhD[4], Michel Neunlist, PhD[5,6] , Bertrand Cariou, MD-PhD[2], & Cédric Le May, PhD[1].

1. l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France;

2. l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

3. Service de Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU de Nantes, France

4. Plateforme de Lipidomique-uBourgogne, INSERM UMR866 / LabEx LipSTIC, Dijon, France

5. INSERM, U913, Nantes, F-44093, France

6. CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

Setting: INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291, l'Institut du Thorax, INSERM U913 Nantes, France.

Corresponding author: Claire Blanchard

Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU Hôtel Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes cedex 1. France

Mail: Claire.blanchard@chu-nantes.fr

Tel: 00 33 2 40 08 30 22

Fax: 00 33 2 40 08 41 94

Source of Funding: Région Pays de La Loire (France), CASDEN, Fondation Genavie

ABSTRACT

Background: Altered intestinal permeability, leading to increased lipopolysaccharides (LPS) translocation, has been suggested as a mechanism for insulin resistance associated to obesity.

Objective: To assess the effect of sleeve gastrectomy (SG) on intestinal barrier permeability in diet-induced obese mice.

Setting: Nantes University hospital, France.

Methods: The effect of SG was assessed in C57Bl/6J males fed with a high-fat diet (HFD) four weeks after surgery and compared with sham and pair-fed mice as controls. Paracellular (sulfonic acid) and transcellular (Horseradish peroxidase) permeabilities were measured *ex vivo*. Gene expression of key tight-junctions proteins and inflammatory cytokines were measured in mucosal jejunal and colon, and inguinal adipose tissue. Plasma LPS concentration was measured and separated by reversed phase HPLC, and quantified by MS/MS spectrometry.

Results: We compared SG vs Sham with a mann-Whitney test. SG significantly reduced body weight and improved glucose homeostasis (AUC: -58%; p =0.002). SG induced a decrease of paracellular (p=0.01) and transcellular permeabilities (p=0.03) in jejunum, with increased mRNA expression of tight-junctions proteins Jam A (p=0.02) and occludin (p=0.01). In contrast, both paracellular and transcellular permeabilities were increased in the distal colon after SG (p=0.07 and p=0.03). Plasma LPS level were increased after SG (p=0.03), with concomitant increase of IL1β mRNA levels in adipose tissue (p=0.02).

Conclusions: SG induces significant modifications of intestinal permeability in a differential manner between proximal and distal intestine. Although these changes promote LPS translocation in plasma and low-grade pro-inflammatory state in adipose tissue, they do not impair the improvement of glucose homeostasis after SG.

Keys words: sleeve gastrectomy-LPS-intestinal permeability-inflammation- glucose homeostasis

INTRODUCTION

Obesity is a major public health issue, with a prevalence of 4 to 28 % for men and 6.2 to 36.5 % for women in Europe (from 2003 till 2008). Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM). Amongst bariatric procedures, sleeve gastrectomy (SG) is the most frequently used in many countries.

Large randomized prospective studies have demonstrated that bariatric surgery is an efficient strategy to improve glycemic control or even cure T2DM. [(1)] Numerous studies have focused on the elucidation of molecular mechanisms sustaining the beneficial effects on bariatric surgeries on glucose homeostasis, including increase of incretin hormones secretion or modulation of bile acid signaling. [(2)] On the other hand, previous studies have suggested that alteration of intestinal permeability could be involved in the metabolic complications of obesity. For instance, increased intestinal permeability was observed in animals fed during 4 weeks with a high-fat diet (HFD), with a concomitant decrease of the expression of tight junctions proteins (ZO-1 and occludin). [(3)] These effects have been linked to the modification of the microbiote, with an increase of endotoxemia and intestinal inflammation. [(3)] These results were confirmed in two independent studies. [(4-5)] However, the data on the effect of obesity on intestinal permeability in human remained rare and discordant. [(6)] While, in 2010, a study showed no change in permeability as measured by sugars urinary excretion after Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB); [(7)] the same team highlighted, in 2012, a slight increase of permeability in obese subjects. [(8)] A third study found an increase of gastroduodenal permeability in obese subjects without difference between the small intestine and the colon. [(9)] In healthy subjects, a positive correlation was observed between the permeability in the colon and the amount of visceral fat, without relationship with the body mass index. [(10)]

Following a HFD, there is an increase of LPS absorption leading to increased plasma LPS level. [(11)] HFD causes changes of the intestinal microbiota (increase of Gram-negative

bacilli) that increases the activity of TLR-4 (Toll-Like Receptor-4): the LPS receptor in epithelial cells. [12] This results in gastro intestinal inflammation that might be responsible for an alteration of intestinal permeability and an increase of LPS translocation through the epithelial intestinal barrier (EIB). [4] This also results to decreased expression of tight junction. Allowing to this model, the increased intestinal permeability will induce a chronic inflammatory response and a systemic insulin resistance. [3,13-14] Another important contributor for the subclinical inflammation observed in obese subjects is the increase in plasma levels of cytokines (TNF-α, IL-6 and MCP-1), which activate NF-kB. [15-16] In turn, the activation of this pathway will alter the EIB by increasing paracellular permeability.

The consequences of bariatric surgeries on intestinal permeability in obesity state are poorly understood. To date, it remains unclear whether bariatric surgery could restore normal intestinal permeability. One study demonstrated that the intestinal permeability measured by lactulose / mannitol ratio was not significantly altered in patients six months after RYGB. [17] Regarding the expression of tight junctions proteins, a significant increase of claudin 3 and 4 was found 8 months after gastric bypass, whereas occluding and ZO-1 levels were decreased. [18] These changes could contribute to a decrease in intestinal permeability after bariatric surgery.

The aims of this study were to assess the short-term effect of SG in obese mice on paracellular and transcellular permeabilities in jejunum and colon and the subsequent association to LPS translocation, white adipose tissue inflammation and glucose homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Animal and housing

Ten-week-old C57Bl/6 mice (Charles River, L'Arbesle, France) had free access to water and HFD (DIO diet 35%kcal from fat, Laboratoire Safe, France; caseine 25.8%, mineral AIN 1.30%, vitamins 1.30%, phosphate bicalcique 1.70%, calcium carbonate 0.7%, citrate potassium 2.10%, choline bitartrate 0.026%, sucrose 8.9%, cystine 0.384%, cellulose 6.5%, lard 31.7%, soybean oil 3.3%, maltodextrine 16.29%) for 8 weeks prior to bariatric surgeries. All experiments were approved by the Ethic Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study n° 01953.01).

Surgical procedure: sleeve gastrectomy (SG)

A laparotomy was performed under binocular microscope (Leica MZ6 10445945). After we mobilized and externalized the stomach, we sutured the pylorus vessels along the stomach greater curvature with 8.0 Prolene (Ethicon®, Johnson & Jonhson) single sutures to avoid future bleeding. Then we performed a gastrotomy on the anatomical line present between pyloric region (corpus) and the cardiac region of stomach (fundus) and we sutured the incision site with 8.0 Prolene (Ethicon®, Johnson & Jonhson) running suture from the gastro-oesophagal junction. We removed approximately 80% of the stomach with the rumen. We closed muscle layer of abdominal wall and the skin using 5.0 Prolene interrupted sutures.

Mice undergoing a sham operation were used as controls. The sham operation consisted of laparotomy, and mobilization the stomach, during the same time of sleeve procedure. It was performed in mice that were carefully matched for plasma total cholesterol levels and body with mice undergoing SG procedure. Mice with pair-fed procedure had the same procedure as sham mice, but these mice received the same quantity of food that mice undergoing SG procedure.

Postoperative care:

After the surgery, we stopped isoflurane and continued with O2 flow of 0,8 L/min until mouse fully recover. We placed individually the mouse in a cage in an incubator under 30°C temperature condition during 5 days. In all groups, we gave back free access to gel diet food (Geldiet Highfat®, Safe laboratories; lard 10%, liquid sugar 10%, water 57%) for 5 day after surgery. We reintroduced solid diet 3 days *(DIO diet 35%kcal from fat, Laboratoire Safe, France)* after surgery and we injected subcutaneously buprenorphine (0.1mg/kg, twice daily, from day 0 to day 3 after surgery), meloxicam (1mg/kg, from day 0 to day 3 after surgery), metoclopramide (1mg/kg, from day 0 to day 5 after surgery) and marbofloxacine (10mg/kg, from day 0 to day 3 after surgery).

Food intake measurement

We allowed the mice to recover 1 week after surgery. Mice were placed in individual cage. We measured the amount of solid diet placed in the cage and we weighted the residual food 24 hours after. We repeated the steps as long as required.

Oral glucose tolerance test (oGTT)

Two weeks after surgery, mice were fasted for 6 hours and challenged with an oGTT. The initial blood glucose value was determined from tail blood using a glucometer (One Touch, Reveal®). Mice received an oral bolus of 30% D-glucose solution (2g/Kg) and plasma glucose levels were measured at 15, 30, 60 and 120 minutes post gavage.

Colonic motility measurement:

Colonic motility was evaluated using the fecal pellet output method. [19] Each mouse was placed in individual cage, every 15 minutes for 2 hours, feces produced were harvested. Feces

were weighed (wet weight), dried and finally reweighed (dry weight) to estimate the fecal water content.

Total transit time measurement:

The gavage solution used to assess *in vivo* permeability also contains Carmine Red (60mg/mL) which is not absorbed from the lumen of the gut and could be used to study total GI transit time as previously described. [19] The total transit time was determined by measuring the time between the feeding and the appearance of the first red faeces 2 weeks before and after surgery.

Ex vivo assessment of paracellular permeability in jejunum and colon 4 weeks after surgery

Each biopsy was placed in ice cold Krebs solution (NaH2PO42H2O 0.187 g/L, NaCl 6.84 g/ L, KCl 0.35 g/L, NaHCO 32.10 g/L, Glucose 1.98 g/L, CaCl2.2H2O 0.368 g/L, MgCl2.6H2O 0.244 g/L) and sent to the laboratory for immediate processing and analysis. Each specimen was micro-dissected to separate the mucosa from the submucosa (in the plane of the submucosal blood vessels). Specimens of colon and jejunal mucosa were then mounted in dedicated Ussing chambers (Transcellab, TBC, Paris, France) exposing a mean surface of 0.0314 cm^2. Specimens were bathed on each side in 2 mL of Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12, Invitrogen, France). The media was continuously oxygenated and maintained at 37°C by a gas flow of 95% O2 and 5% CO2. After an equilibration period of 30 min, 200 µL of apical medium was replaced by 200150 µL of fluorescein–5.6 sulfonic acid (SA) (1 mg Ml), (400 Da, Invitrogen,France) and Horseradish peroxidase (HRP) (1mg/ml, Sigma). The fluorescence level of basolateral aliquots of 150 µL was measured at 30 min intervals over a period of 180 min using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by averaging the gradient of change in fluorescence intensity over time using a linear regression fit model measured in the specimens (GraphPad Prism 5, La

Jolla, USA) and transcellular permeability was determined by concentration of HRP, determined by a kinetic enzymatic assay. [20]

Expression of tight junction's markers and cytokines by RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from mouse jejunal and distal colonic biopsies and inguinal adipose tissues using the Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France). cDNA was synthesized using the SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's recommendations. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using primers designed with Primer Blast (NCBI) based on *mus musculus* published nucleotides sequences (Icare) and described in **Table 1**. PCR amplifications were performed using the absolute Blue SYBR Green Fluorescein mix (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol and run on a StepOne+ (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Expression of gene of interest was normalized to the expression of the RPS6 gene, which was measured in parallel as an internal control.

Measure of plasma LPS

Plasma LPS was measured and separated by reversed phase HPLC, and quantitated by MS/MS spectrometry, in plateforme de Lipidomique-uBourgogne, INSERM UMR866 / LabEx LipSTIC, Dijon, France [21]. LPS concentration was determined by direct quantitation of 3-hydroxytetradecanoic acid (or 3HM) by LC/MS/MS. Briefly, 50 µl of plasma spiked with 50 ng of internal standard (3β-hydroxytridecanoic acid 10 mg/ml in ethanol) was hydrolyzed (total 3HM) or not (unesterified 3HM) with 75 µl of NaCl 150 mM and 300 µl of HCl 8 mol for 4 h at 90°C. Free fatty acids were then extracted with 600 µl of distilled water and 5 ml of hexane. After vacuum evaporation of the hexane phase, fatty acids were dissolved in 100 µl of a 40% A/60% B eluent mixture (eluent A, ammonium acetate 5 mM pH 5.0; eluent B, acetonitrile/acetate ammonium 5 mM pH 7.3 96.7%/3.3%). [22] Fatty acid separation was performed in an Infinity 1200 HPLC binary system (Agilent) equipped with a Poroshell 120 EC

C18 100 × 4.6 mm 2.7 µm column (Agilent) set at 30°C. The sample volume injected was 10 µl. A 7 min eluent gradient was established as follows: from 0 to 0.5 min, the flow was maintained constant at 1 ml/min of 80% B; then the proportion of B increased linearly up to 100% in 1 min; concomitantly the flow rate was decreased to 0.5 ml/min; these conditions were maintained constant for 1 min; then the flow rate was increased to 1 ml/min for an additional 2.5 min; finally, the column was reequilibrated with 80% B at 1 ml/min for 2.5 min. MS/MS detection was performed using a QQQ 6460 triple quadruple mass spectrometer (Agilent) equipped with a JetStream ESI source in the negative mode (gas temperature 300°C, gas flow 10 l/min, nebulizer 20 psi, sheath gas temperature 200°C, sheath gas flow 11 l/min, capillary 3,500 V). Nitrogen was used as the collision gas. The mass spectrometer was set up in the selected reaction monitoring (SRM) mode for the quantification of selected ions as follows: for 3-hydroxytetradecanoic acid, precursor ion 243.2 Da, product ion 59 Da, fragmentor 93 V, collision cell 9 eV; for 3-hydroxytridecanoic acid, precursor ion 229.2 Da, product ion 59 Da, fragmentor 110 V, collision cell 10 eV. LPS-derived/esterified 3HM was calculated as the difference between total 3HM (as assessed after HCl hydrolysis) and unesterified/free 3HM (as assessed without HCl hydrolysis).

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed using Prism (GraphPad Prism 5, La Jolla,CA, USA). To determine differences between two groups or between multiple groups, Mann-whitney test or Kruskall–Wallis followed by Dunn's tests were used, respectively. Linear regression analysis was also performed. A P-value <0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Sleeve gastrectomy is an efficient procedure in obese mice

Forty male mice were operated after 8 weeks of HFD. Mice were randomized on body weight and plasma total cholesterol and divided in three experimental groups (Sham, Pair-fed, SG). The average body weight before surgery was 35.8 ±3.9 grams. The average duration of the procedure was 41 ± 7 minutes. The survival rate was 86% after SG. There were 3 deaths in SG group (one bezoar, one fistula and one indeterminate cause) and one death in sham group due to anesthesia.

Compared to baseline (at the moment of surgery), SG significantly reduced body weight at two (-8%, p=0.03) and four weeks post-surgery (-5.5%, p=0.13) (**Figure 1A**). In addition, there was a significant reduction of body weight in SG compared to sham group at day 14, (-13%, p=0.02) and day 21 (-9%, p=0.02) (**Figure 1A**). One week after the surgery, we observed a significant difference of food intake between sham and SG/pair-fed groups (p<0.0001) (**Figure 1B**). Consistently, four weeks after surgery, epididymal white adipose tissue mass was decreased in SG group compared to sham (-22%, p=0.08) and pair-fed groups (-32%, p=0.01) (**Figure 1C**). In addition, an oGTT confirmed that glucose homeostasis was significantly improved 2 weeks after SG compared to control groups, since the total area under the glucose response curve (AUC) was significantly reduced after SG vs sham (p=0.002) (**Figure 1D**).

Sleeve gastrectomy does not alter intestinal transit time and fecal water content

As a first global approach to assess the effect of SG on intestinal function, we measured intestinal transit time and water content in feces in the three groups two weeks after surgery. As shown in **Figures 2A/B,** there was no difference for these parameters between the 3 groups.

Sleeve gastrectomy controls jejunal and colon permeabilities in an opposite manner.

By using *ex-vivo* approach in Ussing chambers, we then measured both paracellular and transcellular permeabilities in jejunum and colon biopsies. SG decreases the paracellular

permeability as reflected by reduced sulfonic acid (SA) intestinal transport (-39%, p=0.01), as well as transcellular permeability with reduced HRP flux (-45%, p=0.03) in jejunum, compared to sham group (**Figures 3A-B**). Consistently, these changes in jejunal permeabilities were associated with a higher mRNA expression of Jam A (+31%, p=0.02; **Figure 3C**) and occludin (+34%, p=0.01; **Figure 3D**) in SG group; while the ZO1 mRNA levels were not significantly altered (p=0.27; **Figure 3E**). By contrast, both paracellular and transcellular permeabilities were increased in the distal colon of sleeve-operated mice compared to sham group (respectively + 26%, p=0.07 and + 44%, p=0.03; **Figure 4A-B**), despite no significant changes in occludin, Jam A or ZO1 mRNA expression (**Figure 4C-E**).

Effect of sleeve gastrectomy on LPS translocation and expression of pro-inflammatory markers in adipose tissue

In order to determine whether altered intestinal permeability following SG affects LPS translocation, we measured plasma LPS in SG and control mice. Interestingly, 4 weeks after surgery, plasma LPS level were significantly increased in SG compared to sham control mice (+28%, p=0.03) (**Figure 5).** In jejunum and colon, there were no modifications of gene expression of proinflammatory cytokines (Il6, TNFα, IFNγ) in SG compared to control groups (*data not shown*). By contrast, in the inguinal white adipose tissue, there was a significant increase in IL1β mRNA levels in SG compared to sham group (+30%, p=0.02), with a trend for an increase of TNFα mRNA levels (+33%, p=0.11), while there was no change of IL1β expression (p=0.35) (**Figure 6A, B, C**).

DISCUSSION

Bariatric surgery is the most efficient approach to reduce body weight and metabolic complications related to morbid obesity. Altered intestinal permeability, leading to increased LPS translocation, has been suggested as a mechanism for chronic inflammatory state and insulin resistance associated to morbid obesity. Using a mouse model of SG, here we investigated the effect of this widely used bariatric procedure on intestinal permeability and the link with LPS translocation and adipose tissue inflammation.

First of all, we confirmed the beneficial metabolic effects of SG. Indeed, we observed a significant reduction of body weight and adiposity as well as a significant improvement of glucose homeostasis during an oGTT, thereby validating our surgical model of SG. [23-24] Then, we had a more specific look on intestinal function. Neither intestinal transit time nor the water content in the feces were significantly modified following SG. While it is known that gastric emptying is increased after SG, only one small study had shown a decrease of intestinal transit time 4 months after SG in human. [25]

In our study, we showed for the first time, that four weeks after SG, mice had a decrease of paracellular and transcellular permeabilities in the jejunum, whereas the opposite phenotype (*i.e.* increase of paracellular and transcellular permeabilities) was observed in the colon. Only few studies had studied the impact of bariatric surgery on intestinal permeability. Using the ratio of lactulose/mannitol, it was reported that the intestinal permeability was not modified 6 months after RYGB surgery in a small group of 16 morbidly obese patients. [17] In accordance with our present data observed in mice, another study performed 8 months after RYGB showed an increased expression of tight junction proteins and a decreased paracellular permeability in human proximal intestine. [18] In our study, the increased mRNA expression of tight junction proteins such as Jam A and occludin in the jejunum might have contributed to the reduced proximal intestinal permeability assessed *ex-vivo*. One striking and novel finding is the fact that

SG affects intestinal permeability differentially all along the gastrointestinal tract, with an increased permeability in the colon after SG. It would be interesting to verify whether this phenomenon also occurs in human. In contrast to what observed in the jejunum, there was no significant difference regarding the expression of tight junction proteins following SG in the colon. Thus, the underlying mechanisms sustaining this increased colonic permeability remain to be established.

Our study also demonstrated that plasma LPS levels are significantly increased in SG-operated compared to sham control mice. These results were obtained a short time after SG (four weeks). We next determined whether this plasma LPS increase could favor pro-inflammation and we found that in the inguinal adipose tissue, IL1β mRNA levels was significantly induced with also a trend for TNFα mRNA levels in SG compared to sham group. Altogether, these data suggest that the increased intestinal permeability in the colon could have contributed to this increased LPS translocation. Importantly, despite this increases LPS translocation, glucose homeostasis was improved after SG, suggesting that the other beneficial metabolic effects of SG overcome this increased colonic permeability.

As a future work, it would be interesting to assess whether this low-grade inflammatory reaction also occurs in other tissues such as the liver and whether the other bariatric procedures, especially RYGB, had the same effect on intestinal permeability.

CONCLUSION

SG induces significant modifications of intestinal paracellular and transcellular permeability by altering the expression of proteins involved in tight junctions. These changes could favor the LPS translocation in plasma, thus promoting a low-grade pro-inflammatory state in adipose tissue, but they don't overcome the beneficial effect of SG on glucose homeostasis. These effects of SG on intestinal permeability vary with the intestinal location and remain to be assessed after a longer period following surgery.

ACKNOWLEDGEMENTS :

We thank Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in the setting of the animals care protocol. We thank Julien Chevalier (INSERM, U913, Nantes, F-44093, France), Audrey Ayer (l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France) and Lucie Arnaud (l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France) for their help to fill the data and do the animal handler. We thank Thomas Gautier (Plateforme de Lipidomique-uBourgogne, INSERM UMR866 / LabEx LipSTIC, Dijon, France) for the help to fill the data of mass sphectrometry.

REFERENCES

1. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B et al. Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery.N Engl J Med. 2004;351:2683-93.

2. Wu Q, Zhang X, Zhong M, Han H, Liu S, Liu T et al. Effects of Bariatric Surgery on Serum Bile Acid Composition and Conjugation in a Diabetic Rat Model. Obes Surg. 2016 Feb 3. [Epub ahead of print]

3. Cani P, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck A, Delzenne N et al. Changes in Gut microbiota Control Metabolic Endotoxemia Induced Inflammation in High Fat Diet induced Obesity and Diabetes in Mice. Diabetes. 2008; 57, 1470-1481.

4. De La Serre C, Ellis C, Lee J, Hartmann A, Rutledge J, Raybould H. Propensity to high fat diet induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol 2010 ;299, G440-448.

5. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. Nutr Metab . 2010 12;7:19. doi: 10.1186/1743-7075-7-19.

6. Genser L, Poitou C, Brot-Laroche É, Rousset M, Vaillant JC, Clément K et al. Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?] Med Sci. 2006;32:461-9. doi: 10.1051/medsci/20163205012.

7. Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function.Aliment Pharmacol Ther. 2010;32:1307-14. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04475.

8. Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. Clin Nutr. 2012;31:735-40. doi: 10.1016/j.clnu.2012.02.009.

9. Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity.Obesity (Silver Spring). 2013;21:E607-15. doi: 10.1002/oby.20466.

10. Gummesson A, Carlsson LM, Storlien LH, Bäckhed F, Lundin P, Löfgren L et al. Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women.Obesity (Silver Spring). 2011;19:2280-2. doi: 10.1038/oby.2011.251.

11. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. Physiology (Bethesda). 2016;31:283-93. doi: 10.1152/physiol.00041.2015.

12. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. Nat Rev Immunol 2009;9: 692–703.

13. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. PLoS Biol 2011;9: e1001212.

14. Burcelin R, Garidou L, Pomie C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. Sem Immunol 2012;24: 67–74.

15. Daniele G, Guardado Mendoza R, Winnier D, Fiorentino TV, Pengou Z, Cornell J et al. The inflammatory status score including IL-6, TNF-alpha, osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in Type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol 2014;51: 123–131.

16. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 1993;259: 87–91.

17. Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, Diniz Mde F, Sanches SR, da Cunha AS et al. Changes in intestinal permeability after Roux-en-Y gastric bypass. Obes Surg. 2014;24:184-90. doi: 10.1007/s11695-013-1084-y.

18. Casselbrant A, Elias E, Fändriks L, Wallenius V. Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after Roux-en-Y gastric bypass surgery.Surg Obes Relat Dis. 2015;11:45-53. doi: 10.1016/j.soard.2014.05.009.

19. Tasselli M, Chaumette T, Paillusson S, Monnet Y, Lafoux A, Huchet-Cadiou C et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. Neurogastroenterol Motil. 2013 25:e183-93. doi: 10.1111/nmo.12070.

20. Löster K, Schüler C, Heidrich C, Horstkorte R, Reutter W. Quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion using horseradish peroxidase. Anal Biochem. 1997 1;244:96-102.

21. Pais de Barros JP, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. J Lipid Res. 2015;56:1363-9. doi: 10.1194/jlr.D059725.

22. Zehethofer N, Pinto DM, Volmer DA. Plasma free fatty acid profiling in a fish oil human intervention study using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008 ;22:2125-33. doi: 10.1002/rcm.3597.

23. Arapis K, Cavin JB, Gillard L, Cluzeaud F, Lettéron P, Ducroc R et al. Remodeling of the residual gastric mucosa after roux-en-y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats. PLoS One. 2015;30;10:e0121414. doi: 10.1371/journal.pone.0121414. eCollection 2015.

24. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. Nature. 2014;8;509:183-8. doi: 10.1038/nature13135.

25. Melissas J, Leventi A, Klinaki I, Perisinakis K, Koukouraki S, de Bree E et al. Alterations of global gastrointestinal motility after sleeve gastrectomy: a prospective study. Ann Surg. 2013;258:976-82. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182774522.

Figure 1

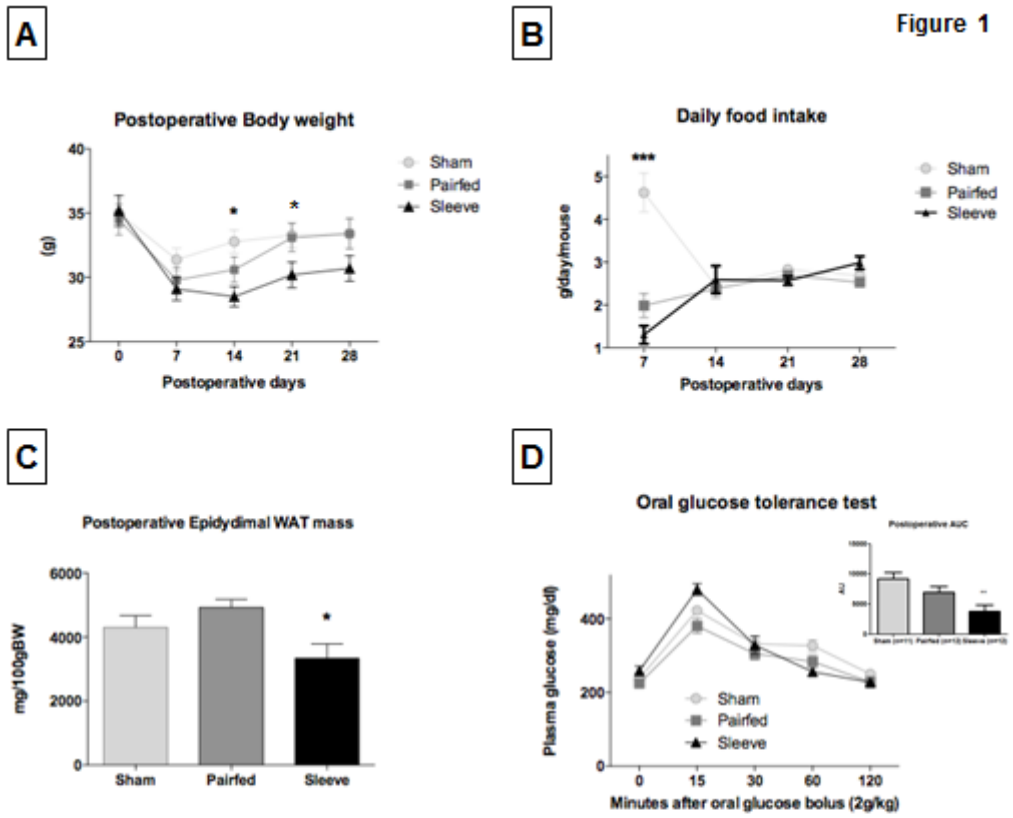


Figure 1: (A) Effect of Sleeve gastrectomy (SG) on body weight; (B) Effect of SG on daily food intake; (C) Effect of SG on epididymal white adipose tissue mass. (D) Effect of SG on glucose tolerance, area under curve (AUC) during an oGTT (see Material & Methods for more details). Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * $p<0.05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, Mann-Whitney test between sham and sleeve groups.

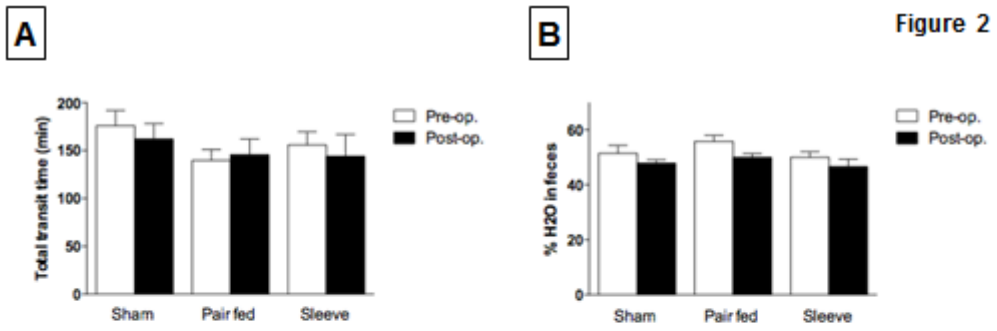


Figure 2: (A) Effect of Sleeve gastrectomy on Total Transit Time and (B) fecal water content. Histograms represent mean value ± Standard Error of the Mean.

Figure 3

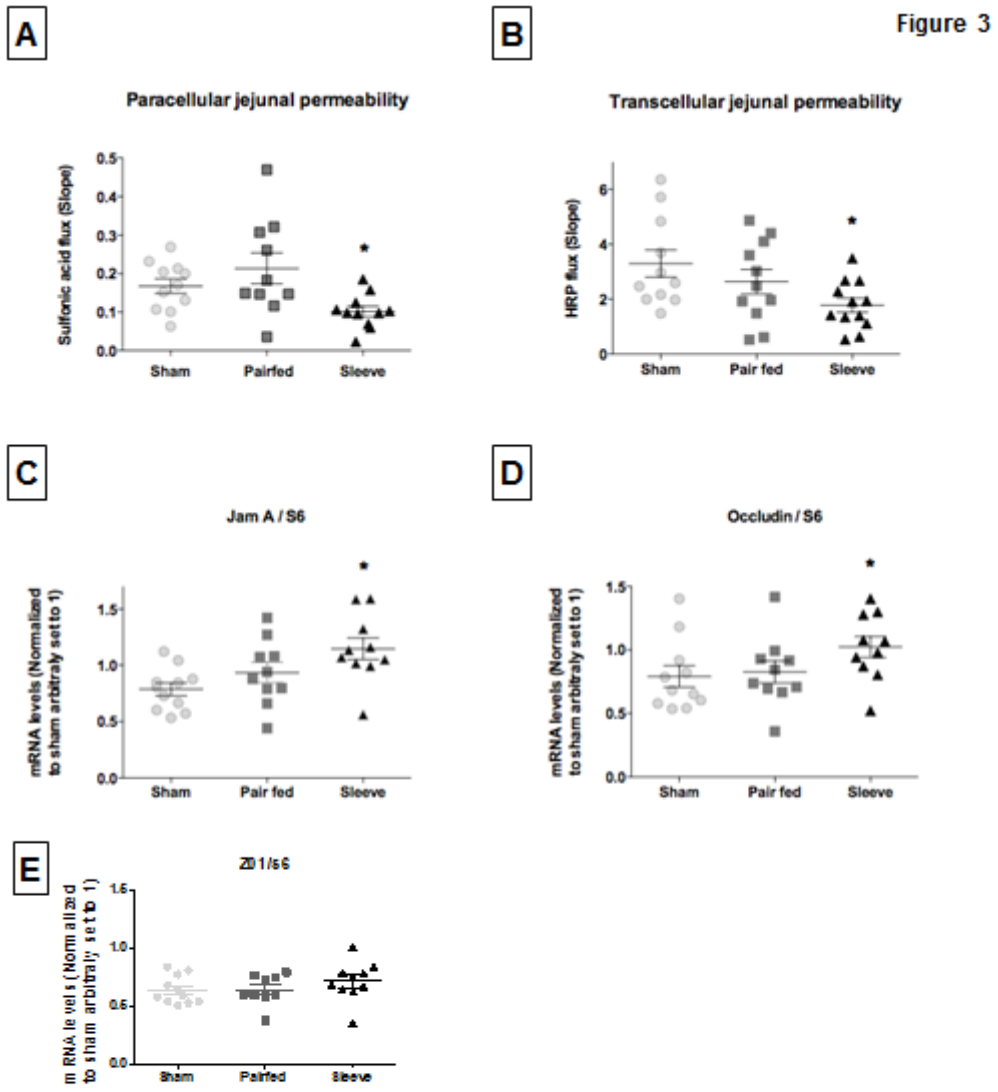


Figure 3: Effect of Sleeve gastrectomy (SG) on *ex-vivo* paracellular permeability (SA flux) (**A**) and on transcellular permeability (HRP flux) (**B**); Junctional Adhesion Molecule A (Jam A) (**C**), occludin (**D**) and Zonula Occludens-1 (Zo1) (**E**) mRNA expression levels in jejunum biopsies. Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * $p<0.05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Mann-Whitney test between sham and sleeve groups.

Figure 4

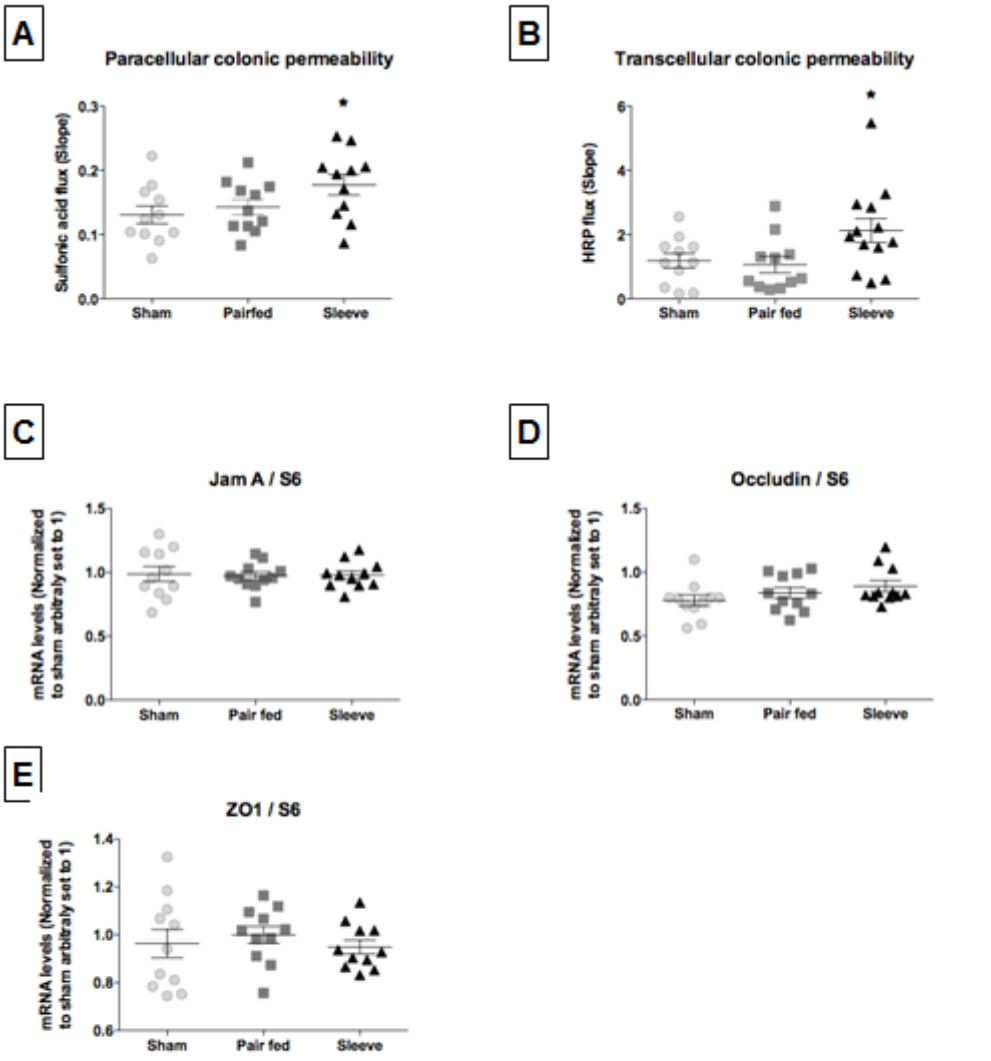


Figure 4: Effect of Sleeve gastrectomy on *ex-vivo* paracellular permeability (SA flux) (**A**) and on transcellular permeability (HRP flux) (**B**); Junctional Adhesion Molecule A (Jam A) (**C**), occludin (**D**) and Zonula Occludens 1 (ZO-1) (**E**) mRNA expression levels in colon biopsies . Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * $p<0.05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Mann-Whitney test between sham and sleeve groups.

Figure 5

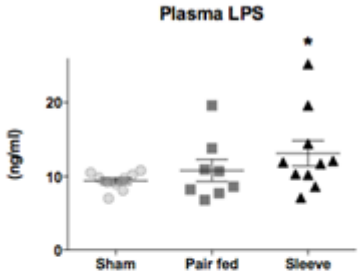


Figure 5: Plasma Lipopolysaccharides (LPS) levels 4 weeks after surgery. Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * p<0.05; ** p<0,01; *** p<0,001. Mann-Whitney test between sham and sleeve groups.

Figure 6

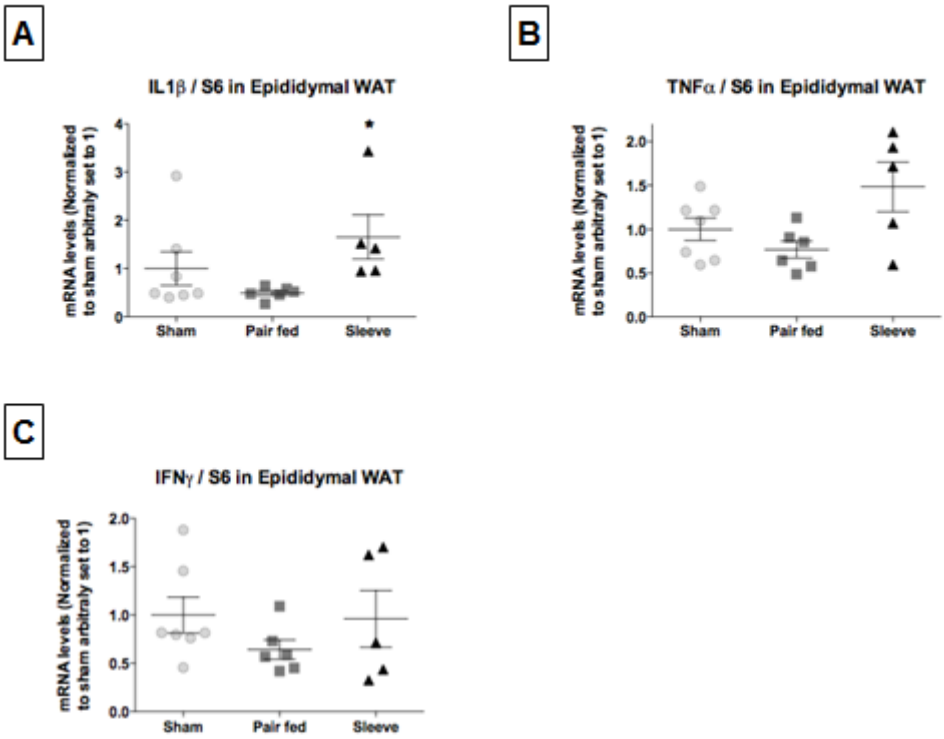


Figure 6: Effect of Sleeve gastrectomy on Interleukin 1 beta (IL1β) (A); Tumor necrosis factor alpha (TNFα) (B); Interferon gamma (IFNγ) (C) mRNA expression levels in inguinal adipose tissue. Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * $p<0.05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Mann-Whitney test between sham and sleeve groups.

Gene	Protein name	Forward primer	Reverse primer
ZO-1	Zonula Occludens 1	AAGAATATGGTCTTCGATTGGC	ATTTTCTGTCACAGTACCATTTATCTTC
Occludin	Occludin	GGTTAAAAATGTGTCTGCAGG	GAGGCTGCCTGAAGTCATCCA
JAM A	Junctional Adhesion Molecule A	ATAACAGCCAGATCACAGCTCC	TGGAGGTACAAGCACAGTGAG
IFNg	Interferon Gamma	CTGGAGGAACTGGCAAAAGGAT	GGTTGTTGACCTCAAACTTGGC
TNFa	Tumor Necrosis Factor alpha	GAACTTCGGGGTGATCGGTCC	GCCACTCCAGCTGCTCCTCC
IL1B	Interleukine 1 beta	TCCTGTGTGATGAAAGACGGCAC	GTGCTGATGTACCAGTTGGGGAAC
S6	ribosomal protein S6	GAAGCGCAAGTCTGTTCGTG	GTCCTGGGCTTCTTACCTTC

Table 1: Table of used Primers.

Article 3 :

Lors d'une chirurgie bariatrique, il existe une modification anatomique des structures digestives, celles-ci étant impliquées dans de nombreux mécanismes mais pas seulement. En effet l'intestin joue un rôle majeur dans le métabolisme du cholestérol. L'originalité de ce travail a été de s'intéresser aux conséquences de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol, et plus précisement sur le TICE. Comme détaillé plus tôt dans l'introduction, il existe une amélioration quelque soit la technique de la concentration plasmatique des TG après chirurgie bariatrique. Par contre, il existe une baisse de la concentration plasmatique en LDL plus importante après le RYGBP, la BD versus la sleeve gastrectomie ou encore l'anneau. L'objectif ce de travail a été de comprendre les conséquences de la gastrectomie de type sleeve, du bypass Roux-en-Y modifié sur le métabolisme du cholestérol dans un modèle murin, afin de permettre par la suite en fonction des résultats obtenus, d'utiliser des modèles de souris génétiquement modifiées.

Nos résultats confirment ce qui a été retrouvé dans la littérature des patients opérés après chirurgie bariatrique et permettent de mieux comprendre pourquoi le RYGBP est plus efficace que la sleeve gastrectomie en termes de baisse de la cholestérolémie. Cette baisse semble donc être due à l'augmentation des voies d'élimination du cholestérol plasmatique notamment dû à l'augmentation significative de l'excrétion transintestinale du cholestérol et à la diminution significative de l'absorption intestinale du cholestérol après RYGBP. De plus, il existe une modification de la quantité et de la composition des acides biliaires fécales et plasmatiques après RYGBP. L'origine moléculaire responsable de l'augmentation du TICE post RYGBP reste pour le moment inconnu, il serait intéressant de déterminer dans le futur si la modification du flux d'acides biliaires affecte le TICE et de réaliser ces modèles sur des souris plus proches du profil lipidique des patients (Souris ApoE KO et LDLr KO).

Effects of bariatric surgeries on cholesterol metabolism in mice

Claire Blanchard[1, 2]*, François Moreau[1]*, Audrey Ayer[1], Laurence Toque[1], Damien Garçon[1], Lucie Arnaud[1], Frederic Borel[1, 2], Audrey Aguesse[3], Mickael Croyal[3], Michel Krempf[3], Xavier Prieur[1], Michel Neunlist[5, 6], Bertrand Cariou[1, 4] and Cedric Le May[1]#.

1. l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France;

2. Service de Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU de Nantes, France

3. INRA, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, CHU Hôtel-Dieu, F-44000 Nantes, France CRNHO, West Human Nutrition Research Center, CHU, F-44093 Nantes, France.

4. l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

5. INSERM, U913, Nantes, F-44093, France

6. CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

 # CORRESPONDING AUTHOR:

Le May, Cedric

l'Institut du Thorax

INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291

Nantes, France

Cedric.lemay@univ-nantes.fr

cedric.lemay@univ-nantes.fr

Keywords: By-pass, sleeve, Dyslipidemia, Hypercholesterolemia, TICE, bile acid

Setting: INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291, l'Institut du Thorax, Nantes, France.

Source of Funding: Région Pays de La Loire (France), CASDEN, Fondation Genavie, Association Française de Chirurgie (AFC), Fondation avenir, Fondation Leducq.

*These authors contributed equally to this work

Author contributions

CB: Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

FM: Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

AA: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data and animal handler

LT: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data and animal handler

FB: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data and animal handler

DG: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data

LA: Acquisition of data, Analysis and interpretation of data

AA: Acquisition of data

MC: Acquisition of data

MK: Acquisition of data

XP: Analysis and interpretation of data

MN: Analysis and interpretation of data

BC: Conception and design, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

CLM: Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

Abstract

Bariatric surgery appears as the most efficient therapeutic alternative in morbidly obese patients. In addition to its efficiency to decrease body weight, it also improves metabolic complications associated to morbid obesity, such as diabetes, hypertension and dyslipidemia. Although the cholesterol-lowering effect varies with the bariatric procedure, the underlying molecular mechanisms remain poorly defined. This study aims to assess the consequence of both restrictive (sleeve gastrectomy) and malabsorptive (Roux in Y gastric bypass [RYGB]) procedures on cholesterol metabolism in mice. We measured the surgical effect on body weight, food intake, carbohydrate metabolism were. Fecal, transintestinal and biliary cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption were measured by mass spectrometry. As results, we showed that Sleeve gastrectomy had a weak and transient effect on plasma cholesterol whereas Bypass strongly decreases plasma cholesterol levels by increasing fecal cholesterol excretion and TICE and by reducing intestinal cholesterol absorption.

Introduction

Obesity is a major public health issue, with increased prevalence from 4 to 28 % for men and from 6 to 36 % for women in Europe (from 2003 till 2008) (1). Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia, pulling a reduction of both quality of life and life expectancy (2). Currently, bariatric surgery emerges as the therapeutic alternative of choice for morbidly obese patients and is in full progress worldwide (3).

A number of different surgical methods have been developed but sleeve gastrectomy (SG) and Roux en Y gastric bypass (RYGB) are the two most commonly used procedures in clinical practice (3). During the SG procedure, ≈80% of the initial volume of the stomach is removed. SG belongs to the restrictive bariatric techniques that act by increasing satiety. The RYGB is one of the “malabsorptive” techniques. During RYGB, a small gastric pouch (1-2% of total gastric volume) is created and the intestine is rearranged in a Y-shaped anatomy that promotes a delay of digestion and absorption of nutrients. These two techniques lead to significant body weight reduction and improvement of frequently associated comorbidities (high blood pressure, diabetes, dyslipidemia) with a global higher efficiency for RYGB compared to SG (Butchwald et al., 2004).

Dyslipidemia is clearly improved after bariatric surgery, but in a different manner according to the surgical techniques (4). In a large meta-analysis, both SG and RYGB decrease plasma triglyceride (TG) and increase high-density lipoprotein cholesterol levels in a similar extent. In contrast, the decrease of plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL) is more pronounced after a malabsorptive procedure (RYGB, biliopancreatic diversion) than a restrictive surgery (sleeve gastrectomy, gastric banding) (4). These clinical observations suggest that the underlying cellular and molecular mechanisms differ between the surgical techniques to modulate LDL-C metabolism.

The liver is the master regulator of cholesterol metabolism and mainly acts by regulating the endogenous cholesterol synthesis and the uptake of cholesterol containing chylomicron remnants and LDL particles. Beyond the liver, the small intestine is the second

major organ in the control of cholesterol homeostasis (5). First, its anatomical multi-folded structure and the presence of specialized cholesterol transporters allow the efficient absorption of dietary cholesterol. More importantly, it also ensures the re-uptake of newly secreted cholesterol from biliary and non-biliary origins (5, 6). Indeed, the existence of a non-biliary route contributing to fecal sterol loss was suspected decades ago in dogs, rats, and later in humans with impaired biliary secretion, but definitively demonstrated in mice in 2007 (7). This pathway named Trans Intestinal Cholesterol Excretion or TICE exports plasma cholesterol directly via the intestinal barrier to the intestinal lumen (7). In C57BL6 mice under standard chow diet, TICE is responsible for 33% of the fecal cholesterol loss that is twice the amount excreted by the biliary pathway (8). Very recently, *in vivo* kinetic studies performed in humans have shown that TICE contributes to 35% of the fecal cholesterol loss (9). More importantly, the induction of TICE by ezetimibe can considerably increase the fecal neutral sterol excretion (8, 9).

The objective of our study is to better understand the effect of bariatric surgeries on cholesterol homeostasis by assessing the consequence of two mouse models of bariatric surgery, *i.e.* the sleeve gastrectomy and the gastric bypass on the intestinal cholesterol absorption, biliary excretion and TICE.

Materials and methods

Animals and Diets:

8 weeks old C57Bl/6 males were purchased from Charles River (L'Arbesle, France). 10 weeks old C57Bl/6 mice had free access to water and high-fat diet (*DIO diet 35%kcal from fat, Laboratoire Safe, France; caseine 25.8%, mineral AIN 1.30%, vitamins 1.30%, phosphate bicalcique 1.70%, calcium carbonate 0.7%, citrate potassium 2.10%, choline bitartrate 0.026%, sucrose 8.9%, cystine 0.384%, cellulose 6.5%, lard 31.7%, soybean oil 3.3%, maltodextrine 16.29%)* for 8 (SG) or 10-14 weeks (Bypass) prior bariatric surgeries. Three groups were performed: Sham, Pairfed (which received the same quantity of food than SG or Bypass groups) and SG/Bypass. To promote weight gain, mice dedicated to the bypass surgery (Sham & Pairfed & Bypass) received in addition to the high-fat diet, water containing 20% fructose (w/v). All experiments were approved by the Ethic Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study n° 01953.01).

Bariatric surgery

Surgical procedures that are succinctly resumed below have been fully described in a manuscript and videos accepted in the Journal of Visualized Experiment (Article ID #54905 in postproduction).

Preoperative Care. For all the procedures, mice were taken on diet 6 hours before surgery. Then; anesthesia was induced in chamber with 5% isoflurane, air flow of 0,4 L/min and O2 flow 0,4 L/min. Analgesics (Buprenorphine 0,1 mg/kg), antibiotics (Marboflaxine 10 mg/kg) and pro-kinetics (Metoclopramide 1 mg/kg) were administrated via subcutaneous injections. Mice eyes were protected by application of Ocrygel® (TVM) and mice were placed on the working space area a heatpad to maintain homeothermy during surgery. Abdomen from sternum to pelvis was shaved using electric razor and the mouse was wrapped in a plastic wrap. All the procedures were performed with a sterile examination gown; a disposable scrubs cap, a

facemask and sterile gloves and an autoclaved pack containing a sterilized surgical instrument.

Sleeve Gastrectomy (SG). First, we performed under binocular microscope (Leica MZ6 10445945) a laparotomy. Then, we mobilized and externalized the stomach. We sutured the pylorus vessels along the stomach greater curvature with 8.0 Prolene (Ethicon®, Johnson & Jonhson) single sutures to avoid future bleeding. Then we performed a gastrotomy on the anatomical line present between pyloric region (corpus) and the cardiac region of stomach (fundus) and we sutured the incision site with 8.0 Prolene running suture from the gastro-oesophagal junction. We removed approximately 80% of the stomach with the rumen. We closed muscle layer of abdominal wall and the skin using 5.0 Prolene (Ethicon®, Johnson & Jonhson) interrupted sutures.

Roux-en-Y gastric Bypass (Bypass). First, we performed under binocular microscope (Leica MZ6 10445945) a laparotomy. Then, we identified the first small bowel loop and externalized the intestine. We measured 4 cm from the end of the duodenum and performed two ligatures of the intestine with 5.0 Prolene and transected the intestine between the two ligatures. After we placed the distal stump of the two ends facing the alimentary limb 6 cm below the proximal stump. A side-to-side jejunostomy was created with two 8.0 Prolene. We performed a ligature of the Pylorus using a 5.0 Prolene. Then, we transected both ventral side of stomach and distal stump to perform two incisions of the same length and we created an end-to-side gastrojejunostomy with two 8.0 Prolene running sutures. Finally, we closed muscle layer of abdominal wall using 5.0 Prolene . After the procedure, we administrated 25 mL/kg of warm saline solution via subcutaneous injection.

Sham & Pair-fed procedure. Mice undergoing a sham operation were used as controls. The sham operation consisted of laparotomy, and mobilization of gut and stomach, with the same duration procedure than SG or Bypass. Pairfed mice had the same procedure than sham but

they received the same quantity of food than SG or bypass mice. Mice were carefully matched for total cholesterolemia and body weight and randomly assigned to one of the three groups: Sham, Pairfed or SG/Bypass.

Food intake measurement

Mice were allowed to recover one week after surgery and were housed in individual cage. Each day, the amount of solid diet placed in the cage was weighted and the residual food was measured 24 hours later.

Glucose homeostasis assessment

For longitudinal studies, blood glucose levels were measured every Monday in random fed condition. Oral glucose tolerance test s (OGTTs) were performed in 6h fasted mice. Briefly, a blood drop from the tail tip was harvested at time 0. An oral gavage of 20% D-glucose solution (2g/Kg) was then administrated in each mice and blood samples were collected at 15, 30, 60 and 120 minutes post gavage. Blood glucose values were measured by applying blood on a glucose strip inserted in a glucometer (One Touch®, Lifescan).

Biochemistry

Plasma total cholesterol and TG concentrations were determined using a commercially available kit (SOBIODA, France). Plasma PCSK9 levels were assayed in duplicates using a commercially available quantitative sandwich ELISA assay following the manufacturer's instructions (Circulex CY-8079, CycLex Co.). Plasma lipoproteins profile from pooled mouse samples were resolved by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), as previously described (10). Briefly, 200µL of plasma were injected into a MV-7 multi-injection loop and separation was performed on 2 superose 6 HR 10/30 columns in series with an elution flow rate of 0.35 mL/min; 0.5mL was collected for each fraction and the entire profile 6 was completed within 105 minutes. The system was controlled by FPLC DIRECTOR software (Amersham Pharmacia Biotech Inc).

In vivo TICE measurement

Male mice were anesthetized with isoflurane and received 0,3 mg of cholesterol-D7 in 100 µL intralipide by intra penile injection and oral gavage of 0.6 mg cholesterol-D5 in 200 µL olive oil at Day 0. Mice were placed in individual cage for 3 days. Daily feces production was harvested. At Day 3, mice were fasted for 3 hours before being anesthetized by iintraperitoneally injection of a xylazine/ketamine solution (10/80 mg/kg) and placed onto a heat pad. Perfusion solution composition as well as surgical procedures to realize bile duct diversion and proximal intestinal cannulation was performed as described by Van der Velde et al (7, 11). Bile was diverted and collected by gravimetry. Proximal small intestines (including both biliary and alimentary limbs) were perfused using a stable output flux of 5 ml/h. The perfusion solution consisted of a modified solution of KREBS (119,95 mmol/L NaCl, 4,8 mmol/L KCl, 1,2 mmol/L KH_2PO_4, 1,2 mmol/L $MgSO_4.7H_20$, 15 mmol/L sulfonicacid 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane, 1,3 mmol/L $CaCl_2.2H_2O$ and 10 mmol/L L-glutamine ; pH 7,4) supplemented with taurocholate / phosphatidylcholine (10 mmol/L taurocholate : 2mmol/L phosphatidylcholine) as cholesterol acceptors. Blood samples were harvested after the procedure, at moment of sacrifice, to determine plasma cholesterol and D7-C13 cholesterol by GC-MS. Intestinal perfusates were collected over 120 minutes.

Fecal sterol measurement by GC-MS

Mice were placed in individual cage for 3 days. Feces were daily collected, freeze dried, weight and ground. Twenty milligrams of feces were weighed in a tube and resuspended in 500 µl of distilled H2O and 500 µl of 90% ethanol, after adding internal standard (5 alpha-cholestane). Liquid extraction was realized by adding 3 ml of chloroform/methanol (2:1) and centrifuge at 2000 rpm during 5 minutes at 15C°. Inferior phase, containing the lipids, was collected and dry under N2 at 60C°. To measure total cholesterol, the sample was saponified by adding 500 µl of 90% ethanol and 250 µl of 1N NaOH. A double extraction was then realized with respectively 3 and 1 ml of cyclohexane. The upper phase was collected and dry under N2 at 60C°. Finally, sample was derived by sylilation with N-Methyl-N-(trimethylsilyl)

trifluoroacetamide (MSTFA) at 70° for 40 min. Sample was dry under N2 at 60C° and resuspended in 4ml of cyclohexane. Cholesterol, D7-cholesterol and internal standard were measured in these extract by GC-MS.

TICE measurement by GC-MS

One millilitre of Intestinal perfusat, collected after surgery, was extract with 3 ml of chloroform/methanol (2:1). The following steps were similar to the method consisting to extract cholesterol from feces sample detailed above.

Plasma and bile sterol measurement by GC-MS

Plasma and bile sterol extraction were performed from 20µl sample of plasma and bile. Internal standard was added before liquid extraction with 200 µl of cyclohexane/isopropanol (3:2). After centrifugation at 10 000rpm for 10 min at 15°C, superior phase, containing the lipids, was collected and dry under N2 at 60C°. To measure total cholesterol, the sample was saponified by adding 200 µl of 90% ethanol and 100 µl of 1N NaOH. A double extraction was then realized with respectively 1,5 and 1 ml of cyclohexane. The upper phase was collected and dry under N2 at 60C°. Finally, sample was derivatized by sylilation with N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) at 70° for 40 min. Sample was dry under N2 at 60C° and resuspended in 250 µl of cyclohexane. Cholesterol, D7-cholesterol and internal standard were measured in these extract by GC-MS.

Intestinal cholesterol absorption measurement by GC-MS

Each mice received 0,6 mg of cholesterol-D5 in 200µl of olive oil by gavage and 0,3 mg of cholesterol-D^7 in 100µl intralipid by intravenous injection. Three days after, plasma was collected. Plasma sterol extraction was performed from 20µl sample of plasma following the extraction protocol detailed above. Intestinal cholesterol absorption was calculated by measuring the percentage of cholesterol-D5 from the administered dose by the percentage of cholesterol-D7 from the administered dose.

Plasma biliary acids measurement by ULC-MS

Bile acids measurement was performed from 20µl sample of plasma. Cholic acid D4, Ursodeoxycholic acid D4, glyco- chenodeoxycholic acid D4, glyco-deoxycholic acid D4, tauro-cholic acid D4 and tauro-ursodeoxycholic acid were used as internal standard. Each sample was deproteinized with 200 µl of acetonitrile (ACN). After a 10.000 rpm centrifugation at 15 °C during 15 min, the upper phase was collected and dry under N2 at 50 °C. All the sample were resuspended in 100 µl of a mix of solvent constituted by a solvent A (95% ultra pure H2O / 5% acetonitrile (ACN) + 10 mM of ammonium formate) and B (20% ultra pure H2O / 80% ACN + 10 mM of ammonium formate) at 70:30 (A:B).

Analytical conditions

All the GC-MS measures were performed on an Agilent 7890 GC system associated with a 5975 MS detector. The GC was fitted with a HP-1MS capillary column (30,0m x 0,25mm x 0,25 µm; Agilent 19091S-933). A 2 µl sample was injected in split less mode. Injection temperature was set at 250°C and helium was used as carrier gas at 42cm/second in constant linear velocity. For sterol detection, GC oven was programmed as follows: 150°C-(hold 2 min)-(50°C/min)-290°C-(10°C/min)-320-(Hold time 2 min). For biliary acids detection, GC oven was programmed as follows: 150°C-(hold 2 min)-(40°C/min)-270°C-(0,5°C/min)-280. Electronic ionisation was realized at 70 eV. MS-quadripole and MS source were set at 150°C and 230°C respectively. Methods were designed in a full scan mode (m/z: 50-600) and sim mode was used for quantification. For sterol quantification, m/z 372, 301 and 465 were selected to measure 5 alpha-cholestane, cholesterol and D7-cholesterol respectively. For biliary acids measurements, m/z 195 was used to measure alpha/beta and omega murocholic, m/z=370 for DCA, CDCA and HDCA, m/z=460 for UDCA, m/z=368 for CA and m/z=372 for LCA. Solvent delay was set at 5 min for cholesterol measurement and 15 min for biliary acid. All GC-MS data were analyzed with Enhanced chemstation MSD chemstation E02011177 agilent technologies INC.

The ULC-MS/MS measures were performed on a Waters Aquity H-class UPLC associated with a Waters Xero TQD ESI-MS/MS. The UPLC was fitted with a Cortec UPLC C18 column

(1,6 µm - 2,1/100 mm; Waters). A 10 µl sample was injected. The mix of solvent A and B was used as mobile phase at 0,3 ml/min in constant linear velocity. For biles acids detection, UPLC oven was set at 40 °C and programmed as follows: 90% of A / 10% of B hold for 8 min - 55% of A / 45% of B hold for 4 min - 10% of A / 90% of B hold for 2 min - 90% of A / 10% of B hold for 1 min.

Electrospray ionization (ESI) was used in negative mode with a capillary set at 3Kv and a desolvation at 1000L/hour. For biles acids quantification, a pair of ions (mother ion m/z; daughter ion m/z) were selected for each molecule as follow: CA (407,39; 407,35), LCA (375,34; 375,35), DCA (391,33; 391,35), HDCA (391,34; 391,36), CDCA (391,34; 391,36), UDCA (391,33; 391,36), G-CA (464,35; 464,35), G-DCA (448,35; 448,35), G-CDCA (448,36; 448,35), G-UDCA (448,35; 448,34), G-LCA (432,64; 432,64), T-CA (514,31; 514,31), T-LCA (482,32; 482,31), T-DCA (498,31; 498,30), T-HDCA (498,31; 498,30), T-CDCA (498,31; 498,29), T-UDCA (498,31; 498,30), CA D4 (411,35; 411,37), UDCA D4 (395,50; 395,40), T-CA D4 (518,50; 518,40), T-UDCA D4 (), G-CDCA D4 (452,50; 452,40), G-DCA D4 (452,50; 452,40). All UPLC-MS/MS data were integrated and analyzed with MassLynx™ and TargetLynx™ softwares (Waters).

RNA analysis

Total RNA from tissues was purified using Trizol (Life technology, les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from cell samples was purified with the NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel, Hoerdt, France). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed and real-time quantitative PCR was performed using the TaqMan 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primers were designed using the Primer Express 3.1 software and described below. Results are represented as arbitrary units indicating relative expressions by calculation based on the comparative Ct (also called ΔCt) methods after normalisation to cyclophilin or 36B4 as the reference genes (indicated in the figure legend where applicable).

Gene	Protein name	Forward Primer	Reverse Primer
HMGcoA	Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A réductase	CCAGCTTTGTTTCTCCCAAGTG	CTACCGCTTCCTCAAAGCCTTT
SREBP2	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2	GTGCCCTCTCGTTTTACTGAAGT	TACAGGTATAGAAGACGGCCTTGGC
FAS	FAS	TCCTGGAACGAGAACACGATCT	GAGACGTGTCACTCCTGGACTTG
SREBP1	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1	GGCACTAAGTGGCCTCAACCT	GCCACATAGATCTCTGCCAGTGT
LDLR	Low Density Lipoprotein receptor	ACGTGCCGACCTGATGAATTC	GCAGTCATGTTCACGGTCACA
SHP	Small Heterodimer Partner	TCGGACTTCCTTGCTTTGGAT	GGAGGGATTCTGGCTTGAAAGTA
ABCG5	ATP-binding cassette subfamily G former 5	CGTCCAGAACAACACGCTAA	GCAGCATCTGCCACTTATGA
ABCG8	ATP-binding cassette subfamily G former 8	TCTCCAGGTCCTGATTGGTC	GGGTGCTTTTGACTCTGCTC

Western Blot

The intestinal mucosa was harvested as previously described (12) and intestinal mucosa was homogenized in a RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Total lysate proteins were resolved on NuPAGE 4–12% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen) under reducing conditions and transferred using Iblot system onto a nitrocellulose membrane (Invitrogen). Membranes were probed with antibodies raised against the mouse LDLR antibody (R&D Systems Europe, Lille, France) and βactin (Millipore, France). Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (Amersham Biosciences).

Statistics

All results are reported as means ± SEM. Statistical significance was analyzed using ANOVA test and non-parametric Mann-Whitney test, with Graphprism® (Graphpad Software). The values of $p< 0.05$ were considered as significant.

Results

Sleeve and Bypass reduce body weight and improve glucose homeostasis

To assess the effects of bariatric surgeries on cholesterol metabolism, we adapted two models of bariatric surgeries routinely in clinical practices in mice: SG (Figure 1 – Supplement figure 1) and a modified version of the RYGB (Bypass; Figure 1 – Supplement figure 2). Mice had similar body weight prior surgery. SG operated mice displayed a significant weight loss 14 days after surgery compared to sham control mice (28.7g *vs* 31.8g; P=0.008) (**Figure 1A**). SG led to a 15% reduction of food intake compared to sham control mice (**Figure 1C**). The extent of body weight change was more important following Bypass surgery compared to SG. Two weeks after surgery, Bypass operated mice lost 20% of their pre-operative body weight (P<0.001) (**Figure 1B**), despite no change in food intake (**Figure 1D**). Five weeks post surgery, the body weight loss reached 28% of the preoperative weight in the bypass group

compared to only 4% and 9% in the sham and pairfed groups (**Figure 1B**). Longitudinal random-fed blood glucose follow-up as well as OGTT showed a significant improvement in glucose homeostasis after SG and Bypass surgeries (**Figure 1-G**).

By-pass reduces plasma cholesterol by stimulating fecal cholesterol excretion.

Following several weeks of high-fat diet, all mice were equally hypercholesterolemic with plasma cholesterol levels prior surgery over 1.5g/L (**Figure 2A-B**). Two weeks after SG, a significant reduction of plasma total cholesterol was observed in both SG (-36.3%; P<0.0001) and Pairfed groups (-34,9%; P<0,0001), with also a trend for decrease in sham group (-16,1%, P=0.06) (**Figure 2A**). This mild hypocholesterolemic effect was transient and lost three weeks after SG. The fecal cholesterol output measured two weeks after the SG was not significantly altered (**Figure 2D**).

In contrast, Bypass surgery induced a strong and persistent cholesterol-lowering effect with a significant reduction of 42%, 32.4%, 37.5% and 33.7% of total cholesterol 2, 3, 4 and 5 weeks after surgery, respectively (P<0.0001). Consistently with the absence of food intake change, no hypocholesterolemic effect was detected in the Pairfed group compared to sham control mice. FPLC analysis showed a disappearance of the large HDL peak after by-pass surgery compared to the sham control mice (Figure 2 supplemental figure 1). Interestingly, the fecal cholesterol excretion was highly induced (+356%, P=0.0002), five weeks after Bypass surgery (**Figure 3E**). Moreover, we confirmed that plasma D7 cholesterol is excreted almost 4 times more in the Bypass compared to Sham groups (P=0.06) (**Figure 3F**), suggesting that pathways involved in plasma cholesterol elimination are significantly increased following Bypass surgery.

Bypass surgery does not alter plasma PCSK9 concentrations

The proprotein convertase subtilisin kexin of type 9 (PCSK9) is an endogenous inhibitor of the LDL receptor and a master regulator of plasma cholesterol homeostasis (13). Thus, we determined whether the hypocholesterolemic effect of Bypass surgery could be linked to a reduction of plasma PCSK9 expression. Hepatic PCSK9 mRNA levels were significantly increased in the Bypass group compared to sham group (**Table 1**). Consistently, plasma PCSK9 levels were significantly higher in the the Bypass group (**Figure 2C**) and the hepatic LDLR protein content was reduced (Figure 2 supplemental figure 2). Altogether, these data indicate that PCSK9 is not involved in the hypocholesterolemic effect of Bypass surgery.

Bypass surgery does not affect biliary cholesterol efflux but induces TICE

Two pathways have been involved in the plasma cholesterol elimination, the classical biliary route and the newly described TICE pathway. To better understand their respective roles in the increased cholesterol fecal loss, we concomitantly measured the effect of the Bypass procedure on these routes. As shown in figures 3A & B, Bypass did not affect the biliary efflux of cholesterol (**Figure 3A**) or plasma injected D7 cholesterol (**Figure 3B**). Consistently, hepatic ABCG5 & ABCG8 gene expressions are reduced by 63% ($P<0,05$) and 19% (ns) in Bypass compared to sham groups (**Table 1**). In contrast, five weeks after Bypass surgery the TICE was increased by 66% compared to sham procedure (**Figure 3C**). The trans-intestinal efflux of D7 cholesterol also tended to be increased (+48.5%, $P=0.20$), but it failed to reach significance due to higher heterogeneity of results (**Figure 3D**).

Bypass surgery reduces intestinal cholesterol absorption

Finally, using the dual isotope ratio method, we measured the intestinal ability of sham control and Bypass operated mice to absorb orally administrated cholesterol. Five weeks after

surgery, fractional cholesterol absorption was about 40.8% ± 6.3 in the sham group (**Figure 3E**). Intestinal cholesterol absorption was reduced by 36% in the by-pass group (26.1% ± 4.4). Intestinal mucosa mRNA expression analysis in the 3 intestinal limbs (Biliary, Alimentary and Common) did not reveal any change in NPC1L1 but found a significant decrease in CD36 and SRBI in the alimentary limb (**Table 2**).

Bypass surgery alters fecal and plasma bile acids levels

To determine whether Bypass surgery alters bile acids homeostasis in our model, we analyzed the plasma and fecal bile acids contents by mass spectrometry. We found a significant increase in total plasma bile acids levels (**Figure 4A**) as well as a relative change in plasma bile acids composition after Bypass surgery (**Figure 4B**). Almost all classes of bile acids were induced following Bypass but the highest changes involved cholic acid, beta and omega muricholic acid, lithocholic acid and ursodeoxycholic acid (**Figure 4C**). Our data also revealed an increased fecal elimination of alpha and beta muricholic acid in the Bypass compared sham group (**Figure 4D**). At the hepatic level, we did not observe change in the mRNA expression of some bile acid target genes such as CYP7A1, FXR and SHP (**Table 1**).

Discussion

Bariatric surgery is the most efficient approach to reduce body weight and metabolic complications related to morbid obesity. In humans, plasma LDL-C levels are clearly reduced after bariatric surgery, but the magnitude of the LDL-C lowering seems to be dependent on the surgical procedures (4). In this study, we aim to understand the underlying mechanisms sustaining the improvement of the hypercholesterolemia with the 2 most frequent bariatric procedures: SG and RYGB.

To address this question, we developed two mice models of SG and a modified RYGB, as described before (14). As expected (15-17) we observed that both surgeries induce a significant reduction of body weight as well as a significant improvement of glucose homeostasis, thereby validating our surgical models.

Importantly, we demonstrated for the first time a differential effect between SG and Bypass on cholesterol metabolism in mice. On the one hand, SG induces a modest and transient hypocholesterolemic effect, without change in the fecal cholesterol output. This slight effect is likely due to a reduction in food intake since it was similarly observed in pairfed mice. On the other hand, Bypass induced a strong and durable cholesterol lowering effect with an improved pattern of circulating lipoproteins. In contrast to what observed in SG, such beneficial effect did not appear to be linked to a modification in food intake. Firstly, our Bypass model does not affect the stomach size and the daily food intake compared to sham mice. Secondly, we did observed a significant reduction of total cholesterol in the Bypass group compared to the pairfed group. Thus, our mice models mimick the differential effects of SG and RYGB on plasma cholesterol levels in humans (4) which was a prerequisite to further decipher the underlying molecular mechanisms.

The reduction of cholesterol induced by the Bypass seems to be mainly driven by an increase of fecal cholesterol output. To date, two routes have been described to be quantitatively involved in this process, the hepatobiliary and the TICE pathways (reviewed in (6)). In mice, TICE has been demonstrated to be the main route for plasma cholesterol efflux and appears twice as much efficient than the biliary pathway under basal condition (8). *Ex vivo* studies on human intestinal biopsies (11) and *in vivo* kinetic measurement (9) demonstrated that TICE is also active in humans. Whereas the biliary pathway appears to be the main route of elimination under unstimulated condition (9), TICE could be strongly induced pharmacologically to increase the fecal sterol loss (9). Finally, a fraction of the cholesterol excreted by these two routes can be reabsorbed by the small intestine. Therefore, the

fractional cholesterol absorption efficiency can also largely modulate the fecal excretion of plasma cholesterol.

Five weeks after surgery, Bypass does not significantly alter the biliary efflux of both total unlabelled or D7 cholesterol. Consistently, the hepatic mRNA levels of the main biliary cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8 (18) were not increased, but rather reduced after Bypass. In addition, both HMG CoA reductase and SREBP2 mRNA levels are unaffected following Bypass, suggesting that the endogenous synthesis of cholesterol was not altered. Surprisingly, we found a significant reduction of hepatic LDLR gene expression and an increase of hepatic PCSK9 mRNA levels. In accordance with our results, another study recently reported that bypass and biliary diversion strongly induce PCSK9 hepatic expression in mice (19). At the protein level, we confirmed that circulating plasma PCSK9 levels were significantly increased after Bypass and that hepatic LDLR protein content was reduced. Finally, hepatic LRP1 mRNA levels remain unaltered after surgery. Together, these data suggest that bypass does not reduce plasma cholesterol by increasing hepatic plasma cholesterol clearance or hepatobiliary cholesterol efflux.

One of our key finding is that TICE is significantly increased 5 weeks after Bypass. Only few molecular determinants involved in TICE regulation have been yet identified. At the basolateral side of the enterocyte, we have previously shown that the acute regulation of the intestinal LDLR by statins or PCSK9 can alter TICE (11). PCSK9-deficient mice display an increased TICE compared to wild-type littermates, while acute PCSK9 intravenous injection decreases intestinal LDLR content and conversely reduces TICE (11). In the present work, a strong induction of PCSK9 mRNA levels in the three intestinal limbs (biliary, alimentary and common) was observed following Bypass surgery, with a concomitant slight LDLR mRNA levels reduction in the biliary limb. At the apical side, it has been reported that ABCG5/ABCG8 and ABCB1 contribute respectively to 40% and 20% of the apical cholesterol efflux (8,11) and that the pharmacological inhibition of NPC1L1 by ezetimibe significantly increase TICE (9,20). In our model, Bypass did modify neither ABCG5, ABCG8 nor NPC1L1 gene expression in the

three intestinal limbs. Taken together, our data suggest that a regulation of the known TICE modulators, at least at a transcriptional level, is not involved in the increased TICE observed after Bypass. Additional studies are warranted to identify such new modulators of TICE in the context of bariatric surgery.

The increased intestinal PCSK9 gene expression observed five weeks after bypass is intriguing. It has been suggested that PCSK9 is critical for liver regeneration after hepatectomy, Indeed, hepatic PCSK9 mRNA levels are strongly induced in days following partial hepatectomy and PCSK9-deficient mice exhibit lesions in regenerating liver (21). Intestinal remodelling, especially hyperplasia, is known to occurr after either mini gastric bypass or RYGB with increased jejunum diameter, higher villi, and deeper crypts than in sham rats (22). We also noticed such microscopic changes in the three limbs (*data not shown*). Thus, one could hypothesized that PCSK9 may play a role in the intestinal cell proliferation and regeneration after bariatric surgery. The metabolic consequences of bariatric surgeries in PCSK-deficient mice are currently under investigation to assess the functional role of such increased intestinal PCSK9 expression.

In addition to the contribution of TICE in the hypocholesterolemic phénotype following Bypass, we also highlighted a significant reduction of the intestinal ability to absorb cholesterol. These results are in agreement with the literature. Pihlajamäki et al. first found a 26% decrease in intestinal cholesterol absorption one year after RYGB in humans (23). Similar results were confirmed later by Benetti et al (24). As potential mechanistic explanations, it is well admitted that RYGB delays the contact between bile salts and the dietary bolus, impairing micelle formation and reducing the time of exposure of nutrients with intestinal absorption area. We next determined whether Bypass can alter the gene expression of intestinal cholesterol transporters. As detailled before, neither NPC1L1 nor ABCG5/ABCG8 gene expression are altered in the small intestine from Bypass operated mice. In contrast, CD36 and SRBI mRNA levels are reduced in the alimentary limb after Bypass. The functional importance of SRBI in cholesterol absorption is still controversial given the opposite results obtained from both in

vitro and mouse studies (25-27). In accordance with a potential link between decreased CD36 expression and reduced cholesterol intestinal absorption, Nauli et al. reported that CD36-deficient mice showed a significant lymphatic transport of dietary cholesterol (28).

As previously reported in humans (29-31) and rats (31-33)we found that plasma bile acids were drastically increased following Bypass surgery.in mice. In humans, the rise in plasma bile acids in obese patients following bariatric surgeries strongly correlates with improved glucose tolerance and lipid metabolism (29,34). Mouse models demonstrated that the nuclear receptor FXR is required for mediating the beneficial effect of SG on glucose homeostasis, potentially via changes in gut microbiota (16). In our model, we did not measured significant changes in hepatic expression of key genes of bile acid metabolsim such as FXR, SHP & CYP7A1. However, it would be interesting to study whether Bypass surgery can affect cholesterol metabolism in FXR-deficient mice. Another potential link between bile acids and cholesterol metabolism is the reugulation of TICE. If neither the luminal bile acid concentration nor bile acid hydrophobicity seems to affect TICE (35), it has been previously demonstrated that hydrophobic bile acids, such as CA and DCA, induce intestinal cholesterol absorption whereas hydrophilic bile acids, such as MCAs, can strongly repress it (36).

Conclusion

Our results provide a better understanding of the hypocholesterolemic effect of bariatric procedures. RYGB is more effective than SG with a significant and sustained increase of fecal cholesterol excretion. This increase was explained by a concomitant stimulation of TICE pathway and a decrease of cholesterol absorption. From a clinical perspective, these data suggest that malabsorptive procedures (RYGB) should be preferred in obese patients with established hypercholesterolemia of high cardiovascular risk.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in the setting of the animals care protocol. This work was supported by grants from « La région des Pays de la Loire », the « fondation d'avenir », the AFC, the Casden bank, la foundation Leducq.

REFERENCES

1. A. Berghöfer, T. Pischon, T. Reinhold, C. M. Apovian, *et al.*, *BMC Public Health* **8**, 200 (2008).

2. K. R. Fontaine, D. T. Redden, C. Wang, A. O. Westfall, D. B. Allison, *JAMA* **289**, 187-93 (2003).

3. H. Buchwald, D. M. Oien, *Obes Surg* **19**, 1605-11 (2009).

4. H. Buchwald, Y. Avidor, E. Braunwald, M. D. Jensen, *et al.*, *JAMA* **292**, 1724-37 (2004).

5. J. K. Kruit, A. K. Groen, T. J. van Berkel, F. Kuipers, *World J Gastroenterol* **12**, 6429-39 (2006).

6. R. E. Temel, J. M. Brown, *Trends Pharmacol Sci* **36**, 440-51 (2015).

7. A. E. van der Velde, C. L. Vrins, K. van den Oever, C. Kunne, *et al.*, *Gastroenterology* **133**, 967-75 (2007).

8. J. N. van der Veen, T. H. van Dijk, C. L. Vrins, H. van Meer, *et al.*, *J Biol Chem* **284**, 19211-9 (2009).

9. L. Jakulj, T. H. van Dijk, J. Freark de Boer, R. S. Kootte, *et al.*, *Cell Metab* (2016).

10. C. Le May, S. Kourimate, C. Langhi, M. Chétiveaux, *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 684-90 (2009).

11. C. Le May, J. M. Berger, A. Lespine, B. Pillot, *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 1484-93 (2013).

12. A. M. Nik, P. Carlsson, *Biotechniques* **55**, 42-4 (2013).

13. B. Cariou, K. Si-Tayeb, C. Le May, *Curr Opin Lipidol* **26**, 155-61 (2015).

14. D. P. Yin, Q. Gao, L. L. Ma, W. Yan, *et al.*, *Ann Surg* **254**, 73-82 (2011).

15. S. Troy, M. Soty, L. Ribeiro, L. Laval, *et al.*, *Cell Metab* **8**, 201-11 (2008).

16. K. K. Ryan, V. Tremaroli, C. Clemmensen, P. Kovatcheva-Datchary, *et al.*, *Nature* **509**, 183-8 (2014).

17. Z. Hao, M. B. Mumphrey, R. L. Townsend, C. D. Morrison, *et al.*, *Obes Surg* **26**, 2173-82 (2016).

18. L. Yu, R. E. Hammer, J. Li-Hawkins, K. Von Bergmann, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16237-42 (2002).

19. C. R. Flynn, V. L. Albaugh, S. Cai, J. Cheung-Flynn, *et al.*, *Nat Commun* **6**, 7715 (2015).

20. L. Jakulj, M. N. Vissers, C. P. van Roomen, J. N. van der Veen, *et al.*, *FEBS Lett* **584**, 3625-8 (2010).

21. A. Zaid, A. Roubtsova, R. Essalmani, J. Marcinkiewicz, *et al.*, *Hepatology* **48**, 646-54 (2008).

22. J. B. Cavin, E. Voitellier, F. Cluzeaud, N. Kapel, *et al.*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **311**, G492-500 (2016).

23. J. Pihlajamäki, S. Grönlund, M. Simonen, P. Käkelä, *et al.*, *Metabolism* **59**, 866-72 (2010).

24. A. Benetti, M. Del Puppo, A. Crosignani, A. Veronelli, *et al.*, *Diabetes Care* **36**, 1443-7 (2013).

25. P. Mardones, V. Quiñones, L. Amigo, M. Moreno, *et al.*, *J Lipid Res* **42**, 170-80 (2001).

26. L. Cai, E. R. Eckhardt, W. Shi, Z. Zhao, *et al.*, *J Lipid Res* **45**, 253-62 (2004).

27. F. Bietrix, D. Yan, M. Nauze, C. Rolland, *et al.*, *J Biol Chem* **281**, 7214-9 (2006).

28. A. M. Nauli, F. Nassir, S. Zheng, Q. Yang, *et al.*, *Gastroenterology* **131**, 1197-207 (2006).

29. M. E. Patti, S. M. Houten, A. C. Bianco, R. Bernier, *et al.*, *Obesity (Silver Spring)* **17**, 1671-7 (2009).

30. P. L. Jansen, J. van Werven, E. Aarts, F. Berends, *et al.*, *Dig Dis* **29**, 48-51 (2011).

31. V. Spinelli, F. Lalloyer, G. Baud, E. Osto, *et al.*, *Int J Obes (Lond)* **40**, 1260-7 (2016).

32. H. Y. Bhutta, N. Rajpal, W. White, J. M. Freudenberg, *et al.*, *PLoS One* **10**, e0122273 (2015).

33. F. Gao, X. Zhang, L. Zhou, S. Zhou, *et al.*, *Metabolism* **65**, 78-88 (2016).

34. N. N. Ahmad, A. Pfalzer, L. M. Kaplan, *Int J Obes (Lond)* **37**, 1553-9 (2013).

35. A. E. van der Velde, C. L. Vrins, K. van den Oever, I. Seemann, *et al.*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G203-8 (2008).

36. D. Q. Wang, S. Tazuma, D. E. Cohen, M. C. Carey, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G494-502 (2003).

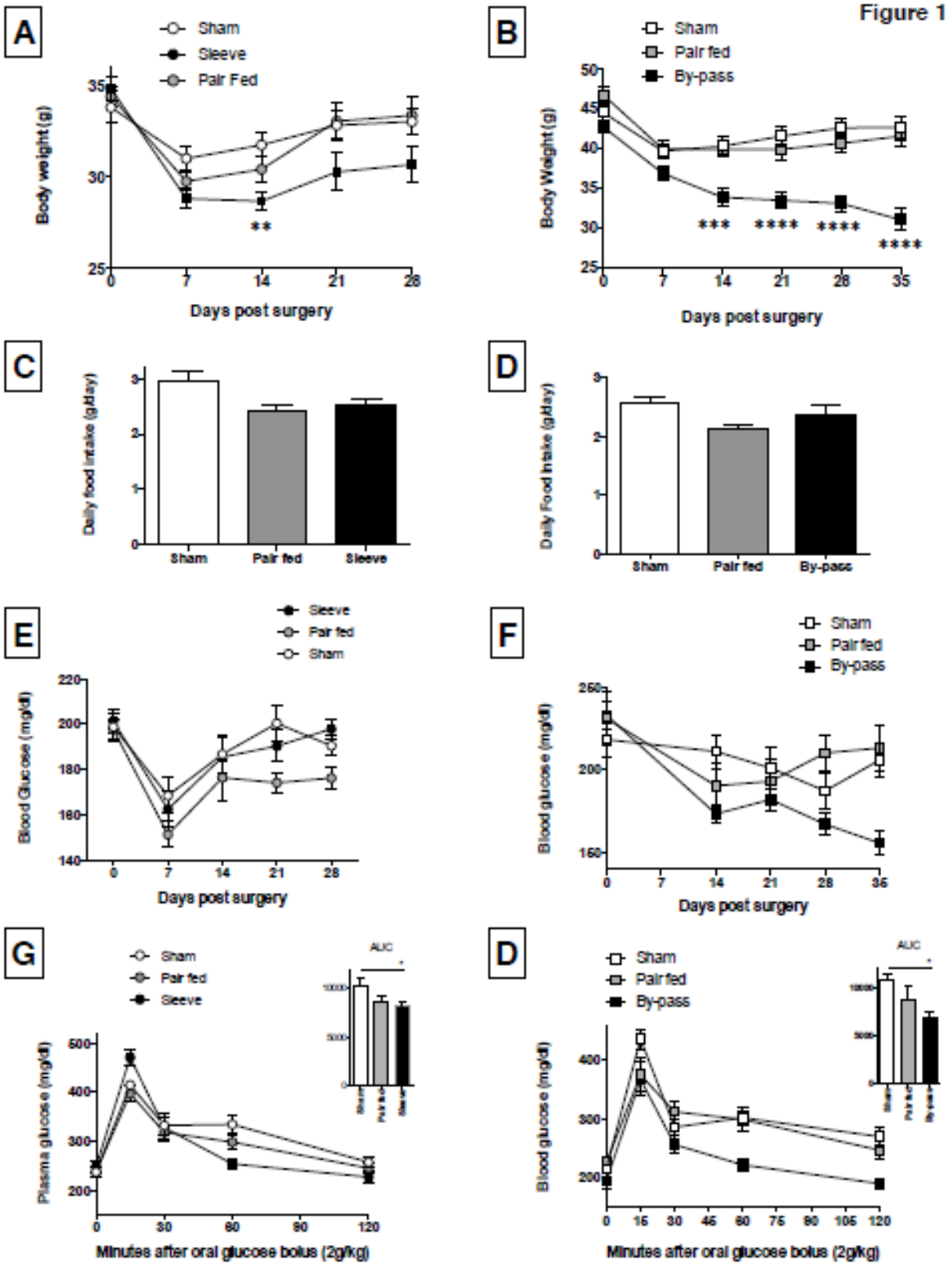
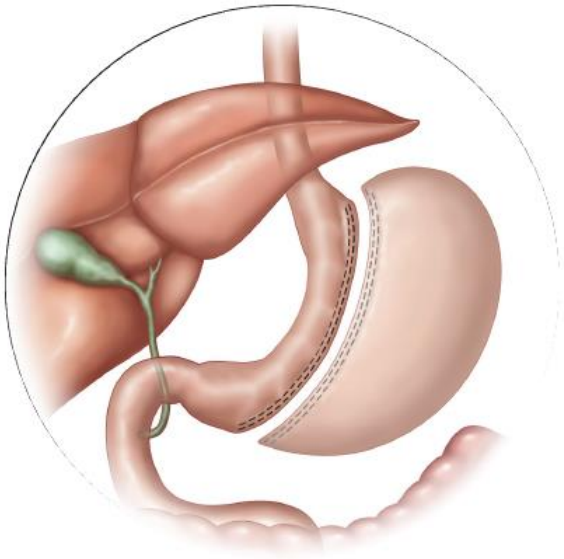


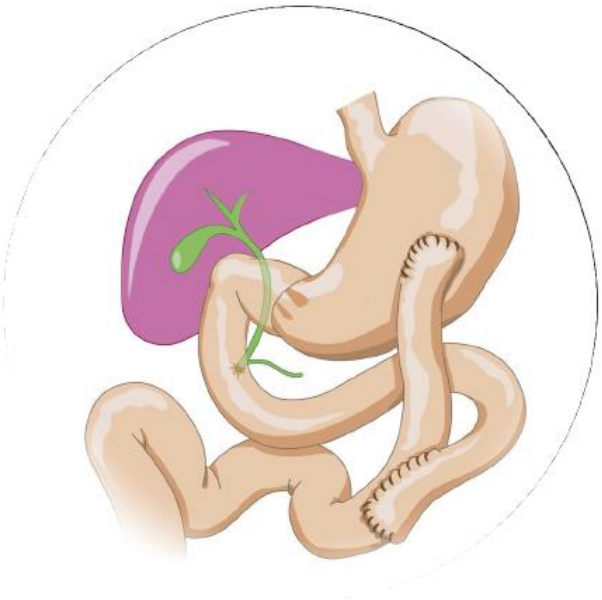
Figure 1: Effect of Sleeve gastrectomy (SG) on body weight **(A)**; Effect of Bypass (RYGB) on body weight **(B)**; Effect of SG on daily food intake **(C)**; Effect of RYGB on daily food intake **(D)**; Effect of SG **(E)** and RYGB **(F)** on glucose tolerance. Effect of SG **(G)** and RYGB **(H)** on area under curve (AUC) during an oGTT . Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean . * p<0.05; ** p<0,01; *** p<0.001, **** p<0,0001, Mann-Whitney test between sham and sleeve and bypassgroups.

Figure 1 supplemental figure 1



Schematic view of the Sleeve Gastrectomy

Figure 1 supplemental figure 2



Schematic view of the modified Roux en Y Gastric bypass

Figure 2

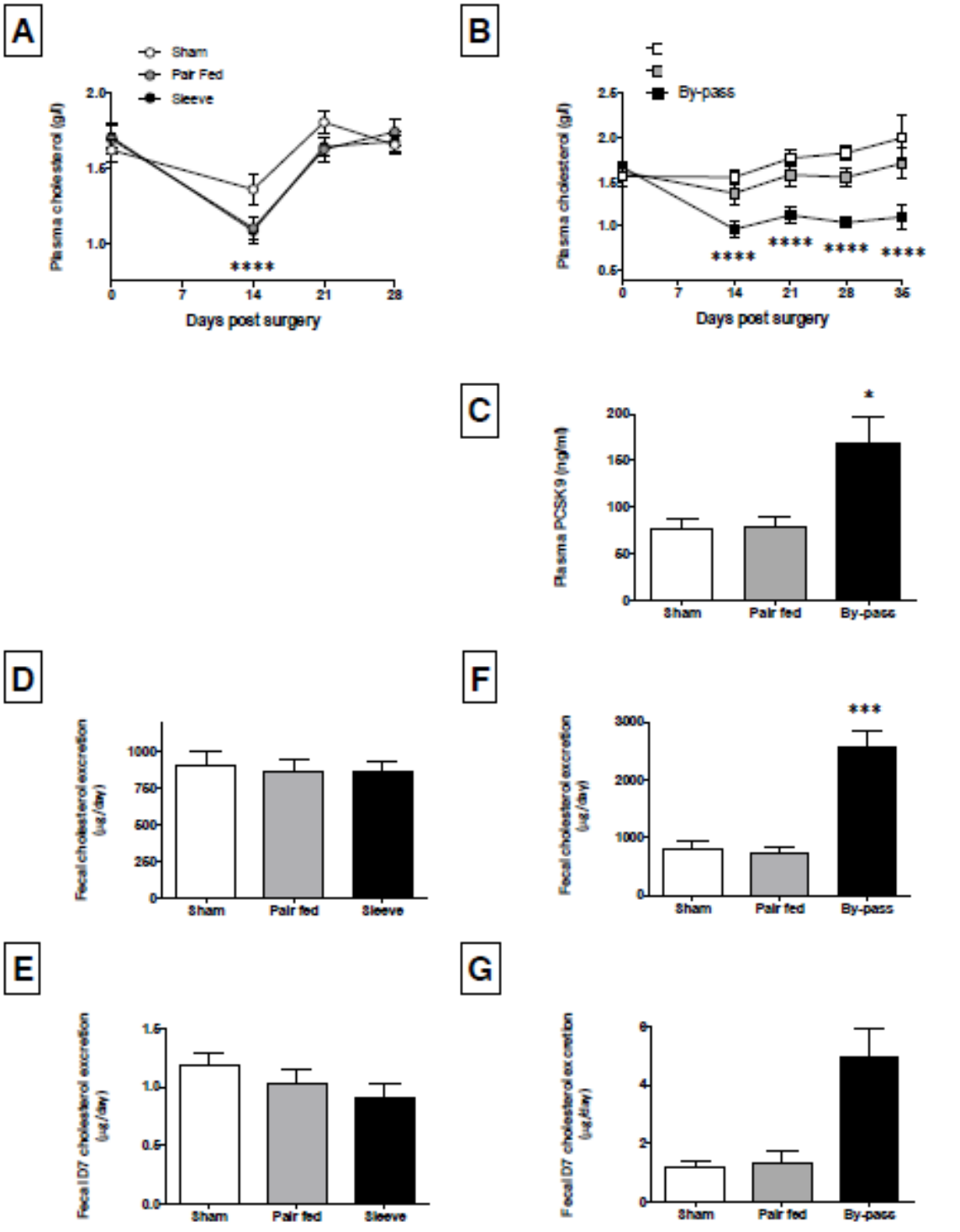
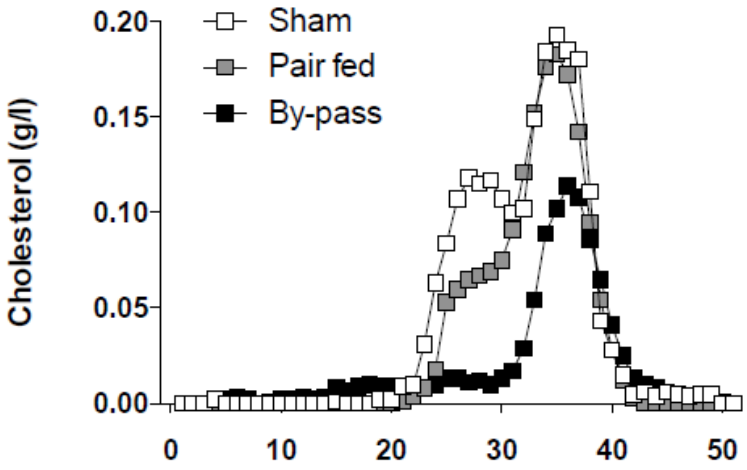


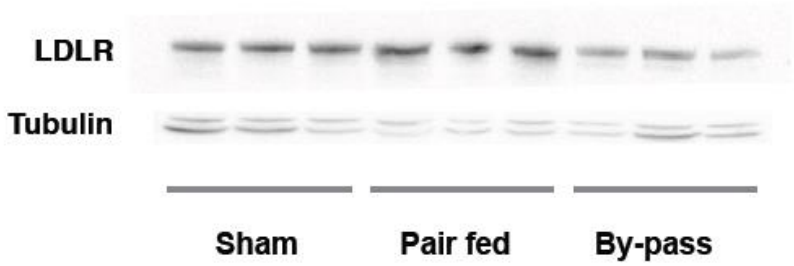
Figure 2: Effect of Sleeve gastrectomy (SG) **(A)** and RYGB **(B)** on cholesterolemia; Effect of RYGB on plasma PCSK9 levels **(C)** ; Effect of SG **(D)** and RYGB **(F)** on fecal cholesterol excretion; Effect of SG **(E)** and RYGB **(G)** on fecal D7 cholesterol excretion. Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * p<0.05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0.0001. Mann-Whitney test between sham and sleeve and bypass groups.

Figure 2 supplemental figure 1



Supplemental 2 Figure 1: Effect of bypass on FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Figure 1 supplemental figure 2



Supplemental Figure 2: Effect of bypass on hepatic LDLR protein content.

Figure 3

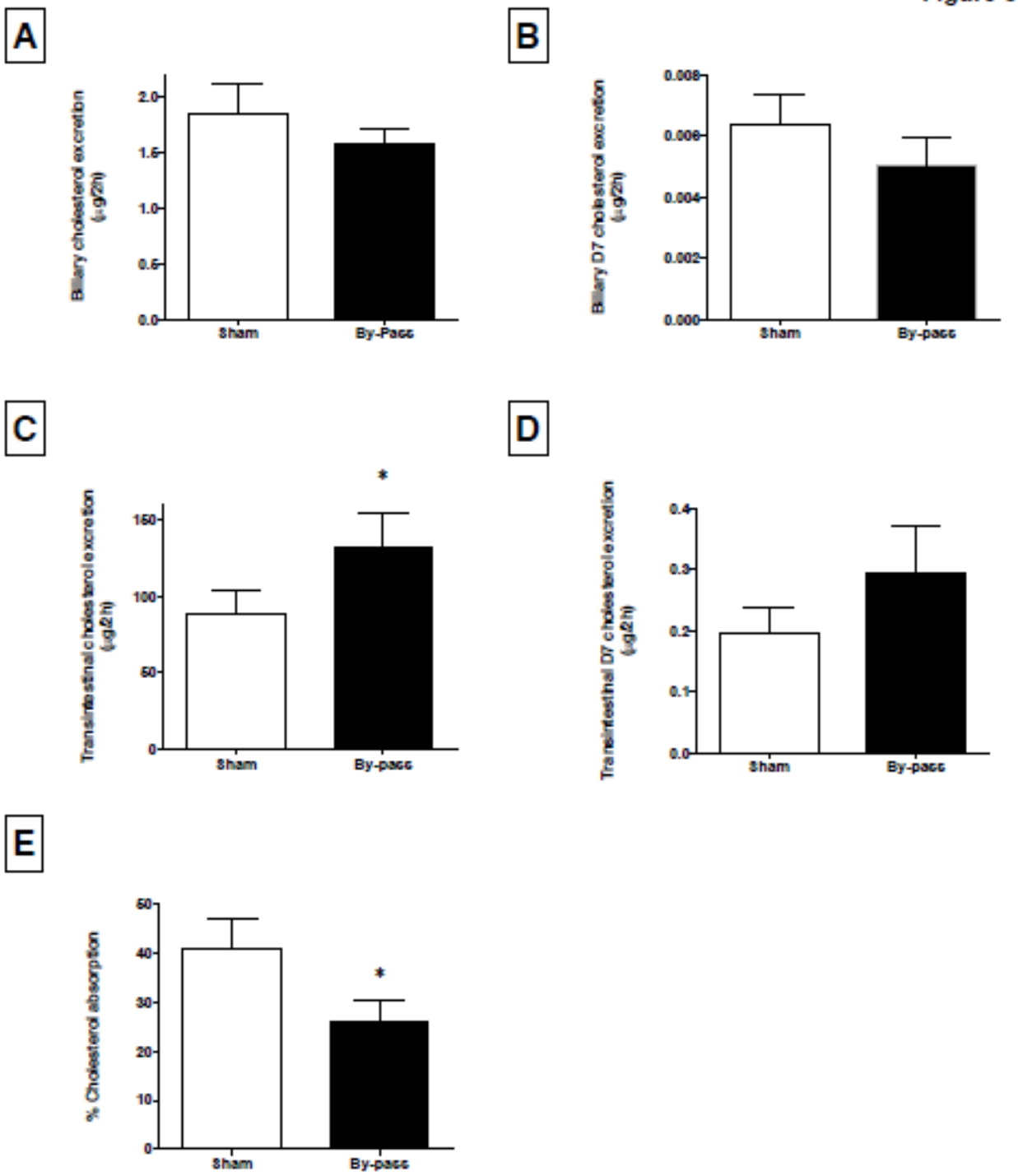


Figure 3: Effect of RYGB on biliary cholesterol excretion **(A)** and D7 biliary cholesterol excretion **(B)**; Effect of RYGB on Transintestinal cholesterol excretion (TICE) **(C)** on Transintestinal D7 cholesterol excretion **(D)**; Effet of RYGB on cholesterol absorption **(E)**. Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * $p<0.05$; Mann-Whitney test between sham and bypass groups.

Figure 4

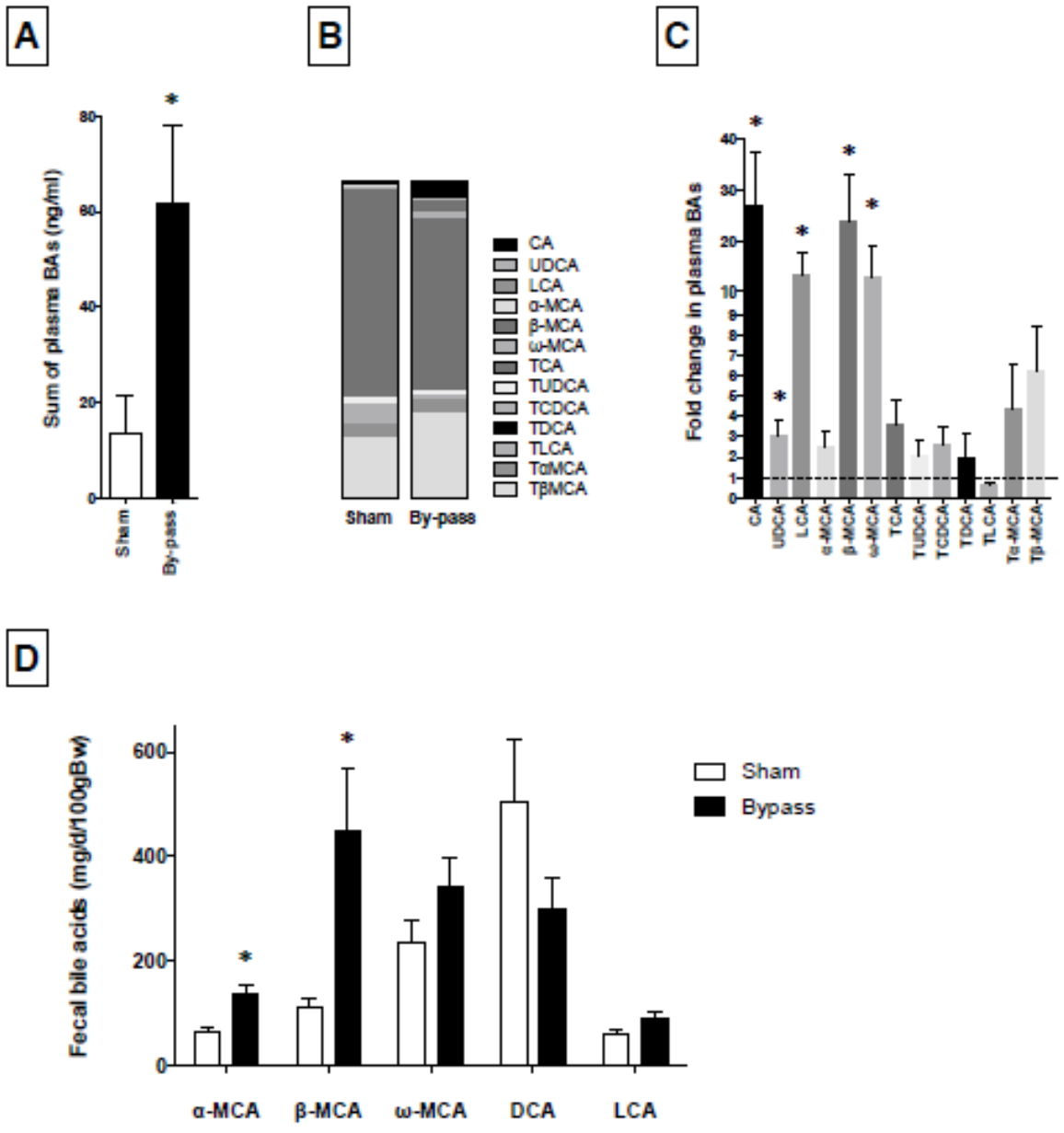


Figure 4: Effect of RYGB on sum of plasma bile acids **(A)**, plasma composition **(B)** and fold change in plasma in bile acids **(C).** Effect of RYGB on fecal bile acids **(D).** Data are shown as mean value ± Standard Error of the Mean. * $p<0.05$; Mann-Whitney test between sham and bypass groups.

Table 1

Effect of by-pass surgery on hepatic gene expression

	Sham	By-pass
SREBP2	1,00 ± 0,09	1,40 ± 0,26
HMGCoA reductase	1,00 ± 0,12	0,96 ± 0,33
LDLR	1,00 ± 0,07	0,38 ± 0,12*
IDOL	1,00 ± 0,08	1,01 ± 0,09
LRP1	1,00 ± 0,09	1,01 ± 0,10
PCSK9	1,00 ± 0,11	2,13 ± 0,49*
CD36	1,00 ± 0,09	0,47 ± 0,07*
ABCA1	1,00 ± 0,13	1,44 ± 0,10*
ABCG5	1,00 ± 0,05	0,37 ± 0,13*
ABCG8	1,00 ± 0,08	0,58 ± 0,19
CYP7A1	1,00 ± 0,21	0,81 ± 0,30
FXR	1,00 ± 0,09	1,23 ± 0,11
SHP	1,00 ± 0,13	1,25 ± 0,21

Table 2

Effect of by-pass surgery on intestinal gene expression

	Alimentary limb		Biliary limb		Common limb	
	Sham	**By-pass**	**Sham**	**By-pass**	**Sham**	**By-pass**
PCSK9	1.00 ± 0.18	12.47 ± 2.29 *	1.00 ± 0.12	2.53 ± 0.72 *	1.00 ± 0.13	13.13 ± 4.43 *
LDLR	1.00 ± 0.07	1.32 ± 0.25	1.00 ± 0.08	0.57 ± 0.14 *	1.00 ± 0.05	1.11 ± 0.23
NPC1L1	1.00 ± 0.18	1.60 ± 0.28	1.00 ± 0.31	1.24 ± 0.60	1.00 ± 0.19	1.86 ± 0.51
ABCG5	1.00 ± 0.13	0.87 ± 0.13	1.00 ± 0.19	1.03 ± 0.16	1.00 ± 0.13	1.33 ± 0.22
ABCG8	1.00 ± 0.17	0.73 ± 0.16	1.00 ± 0.24	0.93 ± 0.17	1.00 ± 0.22	1.28 ± 0.24
CD36	1.00 ± 0.12	0.37 ± 0.16 *	1.00 ± 0.26	0.53 ± 0.10	1.00 ± 0.18	1.08 ± 0.26
SRBI	1.00 ± 0.21	0.18 ± 0.02 *	1.00 ± 0.22	1.98 ± 0.58	1.00 ± 0.22	0.92 ± 0.23

Review 1 :L'excrétion trans-intestinale du cholestérol

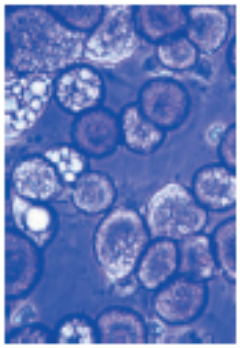
médecine/sciences 2014 ; 30 : 896-901

L'excrétion *trans*-intestinale de cholestérol (TICE)

Une nouvelle voie d'épuration du cholestérol plasmatique

Claire Blanchard, François Moreau, Bertrand Cariou, Cédric Le May

› L'intestin joue un rôle crucial dans l'absorption et la sécrétion lymphatique du cholestérol sous forme de chylomicrons. La découverte de l'excrétion *trans*-intestinale de cholestérol (TICE) renforce l'implication de l'intestin dans le métabolisme du cholestérol. Le TICE est inductible, complémentaire de l'excrétion par la voie biliaire, et permet l'élimination directe du cholestérol sanguin dans la lumière intestinale. Cette voie est mal caractérisée, mais plusieurs acteurs moléculaires du TICE ont été récemment identifiés. Deux études montrent que le TICE est impliqué dans la voie du transport inverse du cholestérol, anti-athérogène, suggérant que sa stimulation pourrait contribuer à réduire les maladies cardiovasculaires. ‹



IRS-UN, institut du thorax, unité Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, 8, quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 1, France.
cedric.lemay@univ-nantes.fr
C. Blanchard et F. Moreau ont contribué de manière équivalente à la rédaction du manuscrit.

La rédaction de cet article[1] intervient à la veille d'une nouvelle étude réalisée par l'unité de surveillance et d'épidémie nutritionnelles dans le cadre du programme national nutrition-santé 2011-2015 visant, entre autres, à déterminer l'état nutritionnel des Français. Il a ainsi été estimé en 2007 que 37,4 % des Français âgés de 65 à 74 ans étaient traités par des molécules hypolipémiantes. L'hypercholestérolémie constitue un des facteurs de risque cardiovasculaires modifiables, et des bénéfices cardiovasculaires sont associés à une diminution de la concentration en LDL (*low density lipoprotein*)-cholestérol (LDLc). Les statines, qui ciblent spécifiquement le LDLc, sont prescrites en première intention, surtout en prévention secondaire des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, elles ne permettent pas, chez les patients à très haut risque cardiovasculaire, d'atteindre les objectifs thérapeutiques recommandés (LDLc < 0,7 g/l) [1]. De nouvelles recherches sont donc en cours pour identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réduire le LDLc [2].

[1] Cette revue a été écrite dans le cadre des « Ateliers du DHU » organisés par le DHU 2038 du CHU de Nantes.

Arguments en faveur d'une excrétion *trans*-intestinale de cholestérol

Jusqu'à récemment, la voie hépatobiliaire était considérée comme la seule voie d'élimination du cholestérol sanguin (*Figure 1*). Celui-ci est capté par le foie, puis excrété dans la bile *via* le canal cholédoque, sous forme de cholestérol ou après sa conversion en acides biliaires. Une fois dans l'intestin, le cholestérol est soit réabsorbé (environ 50 %), soit éliminé dans les fèces.

Cependant, une altération de l'excrétion biliaire de cholestérol n'a pas nécessairement de conséquence sur l'excrétion fécale de cholestérol [3]. Ainsi, Sperry en 1927 ou Pertsemlidis *et al.* en 1973, ont montré que des chiens porteurs d'une dérivation externe de la voie biliaire excrétaient beaucoup plus de cholestérol dans leurs fèces qu'attendu [4]. L'émergence de modèles de rongeurs génétiquement modifiés a permis de confirmer ces premières observations. Ainsi, chez les souris déficientes en transporteurs ABCG5 (*ATP-binding cassette G5*) et ABCG8, l'excrétion biliaire de cholestérol est réduite de 90 % sans que l'absorption intestinale de cholestérol ne soit altérée [5]. Toutefois, ces souris ne présentent qu'une baisse modérée, de l'ordre de 30 à 50 %, de l'excrétion fécale de cholestérol [5]. Les souris déficientes pour le transporteur ABCB4, que caractérise une altération majeure de l'excrétion biliaire des phospholipides et du cholestérol, conservent la capacité d'excréter par voie fécale du cholestérol radiomarqué préalablement injecté par voie veineuse [6]. Enfin, la surexpression hépatique du transporteur Niemann-Pick C1-*like* 1 (NPC1L1) chez la souris (souris transgéniques

NPC1L1) entraîne la réabsorption par les hépatocytes de 90 % du cholestérol excrété dans la bile sans pour autant altérer l'excrétion biliaire des phospholipides et des acides biliaires, l'absorption intestinale ou l'excrétion fécale du cholestérol [7]. L'ensemble de ces travaux suggèrent indirectement l'existence d'une voie alternative intestinale permettant l'élimination directe du cholestérol plasmatique.

En 2007, l'équipe hollandaise de Groen a apporté la première démonstration de l'existence d'une excrétion *trans*-intestinale de cholestérol sanguin (TICE) *(Figure 1)* [8]. Les chercheurs ont créé une dérivation de la voie biliaire et perfusé la lumière intestinale avec une solution iso-osmotique contenant des accepteurs de cholestérol ; puis ils ont mesuré, 30 minutes après l'injection par voie veineuse de cholestérol radioactif, son apparition dans les perfusats intestinaux. Enfin, ce même groupe a démontré que le TICE est principalement actif dans la partie proximale de l'intestin ; les auteurs ont estimé que, chez des souris C57BL6, 33 % du cholestérol fécal proviendraient du TICE, alors que 17 % proviendraient de la voie biliaire. Ces résultats font du TICE une voie majeure d'épuration du cholestérol de l'organisme [9]. Cependant, la contribution relative cette voie à l'excrétion fécale de cholestérol est probablement dépendante du fonds génétique de la souris étudiée ; chez les souris FVB (*Friend virus B-type*), la contribution du TICE serait de 20 % [6].

À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires régulant cette voie métabolique restent très mal caractérisés. Cette revue résume les connaissances actuellement disponibles sur le TICE.

Quelles lipoprotéines fournissent le cholestérol au TICE ?

Le cholestérol, du fait de son hydrophobicité, circule au niveau sanguin dans des complexes moléculaires sphériques constitués de lipides et de protéines (apolipoprotéines, Apo) nommés lipoprotéines. On distingue deux grandes classes de lipoprotéines : les lipoprotéines à Apo-B (chylomicrons, VLDL [*very low density lipoprotein*], LDL) et les lipoprotéines à Apo-A (HDL, *high density lipoprotein*).

L'une des questions actuellement étudiée est de savoir quelle lipoprotéine fournit préférentiellement le cholestérol pour le TICE. Plusieurs études suggèrent que ce sont les lipoprotéines à Apo-B *(Figure 2)*. Ainsi, nous avons montré, *in vivo* chez la souris et *ex vivo* sur des explants de souris sauvages et sur des biopsies jéjunales humaines, que les LDL étaient capables d'apporter du cholestérol au TICE [10]. La même année, Marschall *et al.* ont mis en évidence que les VLDL étaient probablement également impliquées. Ainsi, la réduction de production de VLDL par l'administration d'oligonucléotides antisens dirigés contre la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP, *microsomal triglyceride transfer protein*) réduit significativement le TICE [11]. Le rôle des HDL dans le TICE reste à ce jour plus débattu. Plösch *et al.* ont montré que l'activation des récepteurs nucléaires LXR (*liver X receptor*) augmente l'excrétion fécale de cholestérol de façon similaire chez les souris sauvages et les souris invalidées pour le transporteur ABCA1, chez lesquelles on observe une quasi absence de HDL circulants [12]. De même, les agonistes LXR, des stimulateurs reconnus du TICE (voir plus loin [6, 9]), réduisent dans les mêmes conditions expérimentales l'accumulation intestinale d'éther de cholestérol (cholestérol non métabolisable) provenant d'HDL, faisant douter de l'importance fonctionnelle des HDL dans le TICE [13]. Deux études récentes ont mesuré de façon directe le TICE après une injection intraveineuse d'HDL marqués au cholestérol radioactif. La première suggère que les HDL ont un rôle négligeable dans le TICE [14]. Dans la seconde, nous avons montré que l'activité du TICE est comparable lorsque le cholestérol est apporté par des HDL ou des LDL [10]. Clairement, des études plus approfondies seront nécessaires pour valider ou invalider le rôle physiologique des HDL dans le TICE *(Figure 2)*.

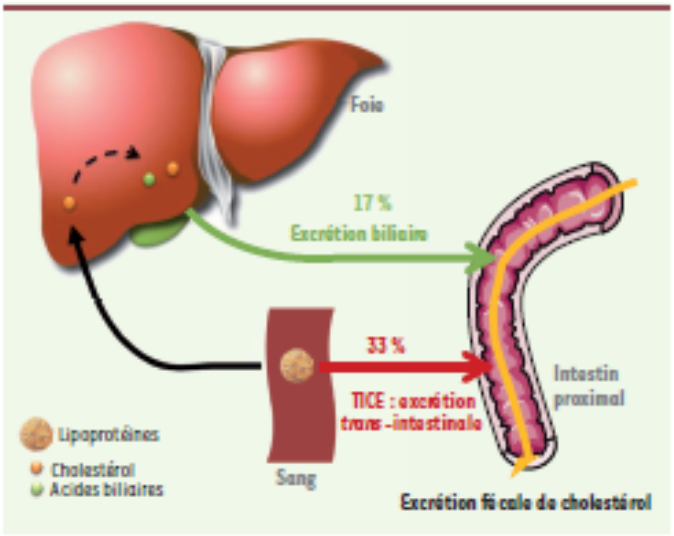


Figure 1. *Représentation schématique de l'excrétion trans-intestinale de cholestérol et de l'excrétion biliaire.*

Identification des transporteurs de cholestérol impliqués dans le TICE

Le récepteur scavenger de classe BI (SRBI), connu pour interagir avec les LDL et HDL, est exprimé au niveau apical et basolatéral des entérocytes. Van der Velde *et al.* ont montré que des souris FVB, nourries avec un régime hyperlipidique ou de type *western*, ont un TICE significativement augmenté par rapport aux souris soumises à un régime

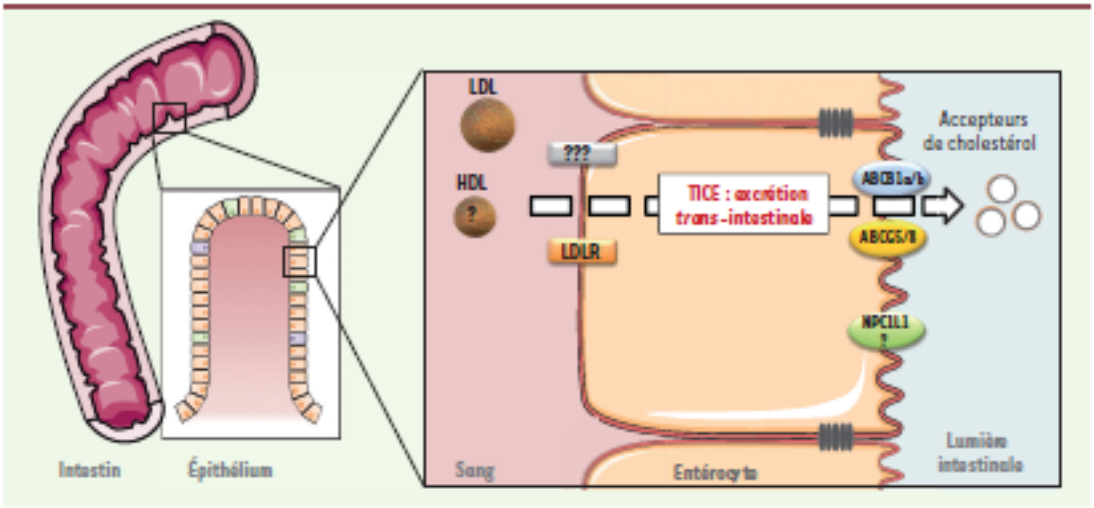


Figure 2. *Acteurs moléculaires impliqués dans le TICE.* Certains acteurs impliqués ou potentiellement impliqués dans le TICE sont représentés : les LDL et leur récepteur (LDLR), les HDL et certains transporteurs intestinaux (ABCB1a/b, ABCG5/8 et NPC1L1).

contrôle [15] (voir plus loin), et ces régimes induisent également l'expression intestinale de SRBI [15]. Au vu de cette corrélation, les auteurs ont suggéré que SRBI pourrait être impliqué de façon active dans le TICE. Néanmoins, chez des souris SRBI *knocked-out* (KO), le TICE est, soit non modifié [14], soit significativement augmenté [15]. De même, une surexpression intestinale de SRBI chez des souris présentant un défaut d'excrétion biliaire de cholestérol n'a pas d'effet notable sur l'excrétion fécale de cholestérol [16]. Ces résultats suggèrent que SRBI ne joue pas un rôle majeur sur l'activité du TICE. De manière alternative, il est également envisageable que la déficience totale de SRBI soit compensée par d'autres protéines exprimées au pôle basolatéral.

Le récepteur des LDL (LDLR) est exprimé à la membrane basolatérale des entérocytes, où il assure l'essentiel du captage entérocytaire des LDL chez les rongeurs *(Figure 2)* [10]. Les souris déficientes en proprotéine convertase subtilisine kexin de type 9 (souris PCSK9), un inhibiteur naturel du LDLR, se caractérisent par une quantité élevée de LDLR intestinal et un TICE significativement augmenté par rapport à celui des souris sauvages [10]. À l'inverse, l'injection de protéine PCSK9 recombinante chez ces souris déficientes dégrade le LDLR intestinal et réduit de 35 % le TICE. L'effet inhibiteur de PCSK9 sur le TICE est dépendant du LDLR, car il n'est pas observé chez des souris LDLR-KO [10]. De façon concordante, les statines, qui augmentent l'expression du LDLR, stimulent le TICE chez des souris sauvages, mais sont sans effet chez des souris LDLR-KO. Ces résultats suggèrent que le LDLR est un acteur clé du TICE, car la modulation aiguë de son expression modifie les niveaux du TICE. Néanmoins, de manière inattendue, la déficience en LDLR chez la souris ne diminue pas le TICE, mais tend à l'augmenter, ce qui suggère la mise en place de voies alternatives de compensation à long terme, qui restent à identifier [10].

À l'heure actuelle, aucune protéine intracellulaire de l'entérocyte n'a été identifiée comme impliquée dans le transport du cholestérol *via* le TICE. Cependant, les protéines NPC1, NPC2, MLN64 (*metastatic lymph node 64 protein*, anciennement STARD3), ORP1L (*oxysterol-binding protein 1L*), LIMP2 (*lysosomal integral membrane protein 2*), ACAT2 (*acetyl-CoA acetyltransferase 2*), Rab7 et Rab9, constituent des candidats potentiels intéressants, compte tenu de leur rôle primordial dans le transport intracellulaire de cholestérol. Par ailleurs, l'activation du récepteur nucléaire PPARδ (*peroxisome proliferator-activated receptor* δ), un inducteur du TICE, augmente l'expression de Rab9 et LIMP2 au niveau intestinal [17].

Au pôle apical des entérocytes, trois complexes protéiques ont été proposés comme contribuant au TICE *(Figure 2)*. La protéine NPC1L1 a été initialement identifiée comme étant le transporteur clé de l'absorption intestinale de cholestérol et la cible moléculaire de l'ézétimibe, un hypolipémiant utilisé en clinique [18]. Deux études utilisant l'ézétimibe pour inhiber NPC1L1 ont présenté des résultats contradictoires sur le TICE. La première étude a montré que l'ézétimibe était sans effet sur le TICE [17], tandis que la seconde a retrouvé une forte induction du TICE [19]. L'hétérodimère ABCG5/ABCG8, impliqué initialement dans l'absorption intestinale du cholestérol, assure une partie de l'efflux apical du TICE *(Figure 2)*. Si la déficience en ABCG8 n'a pas de conséquence sur le TICE [8], celle-ci est réduite de 40 % chez les souris ABCG5-KO par rapport aux souris sauvages [9]. Plus récemment, le rôle du transporteur aux xénobiotiques ABCB1 (ou PGP, *permeability glycoprotein*) a été exploré. ABCB1 est localisé sur la membrane apicale des entérocytes et son rôle dans la résistance

aux antibiotiques est bien caractérisé [20]. Nous avons montré, chez des souris déficientes pour les deux isoformes d'ABCB1, une réduction significative de l'excrétion fécale de cholestérol et une diminution de 20 % du TICE [10]. De même, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique d'ABCB1, le PSC-833, réduit significativement le TICE *ex vivo* sur des explants de souris sauvages, mais est sans effet sur des explants de souris déficientes pour les deux formes d'ABCB1 [10].

Le TICE : une voie métabolique inductible

Chez la souris, le TICE est inductible et modulable par des éléments nutritionnels et pharmacologiques *(Figure 3)*. Van der Velde *et al.* ont ainsi mis en évidence que la présence d'accepteurs du cholestérol dans la lumière intestinale le stimule fortement [8, 15]. En effet, *in vivo*, le TICE est détectable, mais faible, en l'absence d'accepteurs du cholestérol, et plus de 80 % du cholestérol présent dans les perfusats intestinaux ont alors pour origine la seule desquamation entérocytaire. Le taurocholate (TC), un acide biliaire, ou la phosphatidylcholine (PC) stimulent individuellement le TICE, mais avec une efficacité moindre que le mélange TC/PC. Ces molécules permettent la formation de micelles qui vont pouvoir solubiliser le cholestérol excrété par les cellules intestinales. De plus, chez la souris, il semble que le TICE soit peu sensible à la concentration des acides biliaires dans la lumière intestinale et au type d'acides présents [15].

Le statut nutritionnel influe également sur le TICE. Celui-ci est ainsi stimulé respectivement de 50 ou 100 % par les régimes de type western ou hyperlipidique [8]. De plus, un jeûne de courte durée (12 h) réduit le TICE de 28 %, tandis qu'un jeûne prolongé (48 h) l'augmente de 50 % [21]. En plus de leur effet inhibiteur sur l'absorption intestinale du cholestérol [22], les phytostérols stimulent significativement le TICE *(Figure 3)* [23].

Enfin, le TICE est induit par des agents pharmacologiques. L'activation de LXR le stimule fortement [6, 9]. Lorsque des souris sauvages sont nourries avec un régime contenant des agonistes des LXR, leur excrétion fécale de cholestérol est multipliée par trois et la contribution relative du TICE passe de 33 % à 63 % [9]. De même, l'activation de PPARδ [17] ou l'inhibition de NPC1L1 par l'ézétimibe chez la souris augmentent le TICE [19]. Enfin, les statines stimulent le TICE de 71 % et cette activation pourrait en partie contribuer à leur action hypocholestérolémiante *(Figure 3)* [10].

TICE et transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol (RCT, *reverse cholesterol transport*) assure le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie *via* les HDL, et son élimination par voie biliaire [24]. L'activation de cette voie contribue à réduire le cholestérol contenu dans la plaque athéromateuse artérielle et, de ce fait, est considérée comme anti-athérogène. En 2010, une étude a remis en question le dogme faisant de la voie biliaire un élément essentiel du transport inverse du cholestérol. En effet, après l'injection de macrophages chargés en cholestérol tritié, l'excrétion fécale de cholestérol tritié était comparable chez des souris sauvages et des souris transgéniques NPC1L1 qui n'excrètent plus de cholestérol biliaire [7]. Ce résultat est extrêmement important, car il suggère qu'une stimulation thérapeutique du TICE pourrait avoir une action anti-athérogène. Toutefois, un an plus tard, une seconde équipe, à l'aide d'un autre modèle de souris présentant un défaut majeur d'excrétion biliaire (les souris ABCB4-KO), a abouti à la conclusion inverse, à savoir que l'intestin ne peut compenser le défaut hépatique [13]. Cette dernière observation a été renforcée par une autre étude reposant sur l'utilisation de souris NPC1L1-KO surexprimant ou non la protéine NPC1L1 au niveau hépatique [25]. Chez ces souris NPC1L1-KO, caractérisées par un défaut majeur d'absorption intestinale de cholestérol, l'élimination du cholestérol macrophagique par la voie du transport inverse du cholestérol est dépendante d'une voie hépato-biliaire pleinement fonctionnelle [25]. Toutefois, une étude récente atteste de l'importance fonctionnelle du TICE dans le transport inverse du cholestérol. En effet, l'inhibition pharmacologique de la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*)

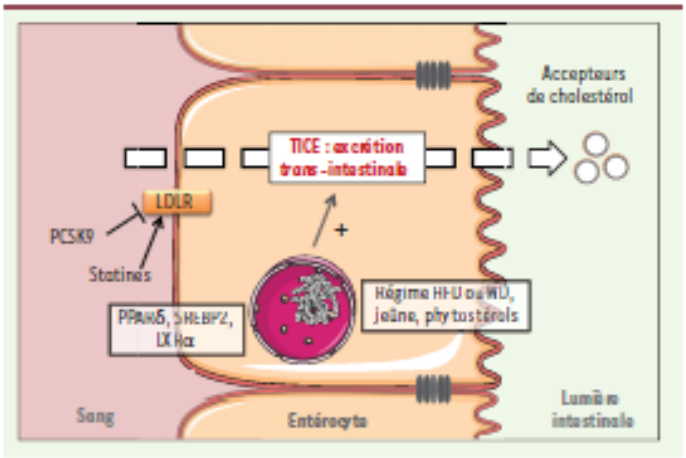


Figure 3. *Modulateurs du TICE.* Le TICE est régulé par le statut nutritionnel, les statines, les phytostérols, les agonistes des LXR, ainsi que par le PPARγ. SREBP2 : *sterol regulatory element-binding protein 2* ; HFD : *high fat diet* ; WD : *western diet*.

stimule le transport inverse du cholestérol et l'excrétion fécale de cholestérol marqué d'origine macrophagique, sans pour autant augmenter l'excrétion biliaire de cholestérol marqué, suggérant un rôle de l'intestin [26]. Le rôle du TICE dans le transport inverse du cholestérol demeure donc controversé.

TICE : les données chez l'homme

La preuve directe de l'existence d'une excrétion *trans*-intestinale de cholestérol chez l'homme doit être encore établie. La difficulté réside dans le fait que cette excrétion *trans*-intestinale et l'excrétion biliaire de cholestérol ont lieu dans la même région anatomique, au niveau de l'intestin proximal. Il est donc nécessaire d'avoir accès à des modèles porteurs d'une dérivation externe ou d'une obstruction complète de la voie hépatobiliaire. Néanmoins, quelques anciennes études cliniques suggèrent de manière indirecte l'existence du TICE chez l'homme. Les premières études, parues en 1959, ont mis en évidence, chez des patients présentant une obstruction de la voie biliaire (en raison d'une tumeur de la tête du pancréas), l'existence d'une excrétion intestinale de 250–400 mg/jour de cholestérol [27, 28]. En utilisant un système de tube à triple lumière inséré dans l'intestin, Simmonds *et al.* ont estimé que l'intestin humain produisait 44 % de la quantité de cholestérol retrouvée au niveau des fèces [29]. Cependant, il est impossible dans cette étude de déterminer les proportions de cholestérol provenant du TICE et de la desquamation des cellules intestinales.

Récemment, nous avons apporté la première preuve que l'intestin humain cultivé *ex vivo* est capable d'excréter du cholestérol directement au niveau du pôle apical des entérocytes. En utilisant des biopsies jéjunales montées sur des chambres d'Ussing, nous avons pu mesurer le TICE en présence de cholestérol sous forme de LDL ou de HDL. De plus, le TICE a pu être stimulée par l'ajout, dans le compartiment apical, de milieu enrichi en phospholipides et en acides biliaires [10]. Dans une étude cinétique non publiée (*International symposium on atherosclerosis 2012*) utilisant des radio-isotopes stables, le groupe de A. Groen estime que le TICE serait à l'origine de plus de 30 % des pertes fécales totales des stérols neutres chez des hommes modérément hypercholestérolémiques.

Conclusion

Le TICE représente une nouvelle voie d'excrétion du cholestérol qui reste à ce jour très mal caractérisée. La question de son implication dans le transport inverse du cholestérol est cruciale et la réponse déterminera si la stimulation spécifique de cette voie métabolique peut être utilisée pour réduire la cholestérolémie, ainsi que l'athérosclérose et ses conséquences cardiovasculaires. Si l'hypothèse de la stimulation pharmacologique du transport inverse du cholestérol par l'augmentation de l'excrétion biliaire de cholestérol est peu envisageable du fait des risques de développement de calculs biliaires, il n'existe pas à l'heure actuelle d'arguments suggérant que l'activation du TICE pourrait avoir des conséquences néfastes pour la santé. ◊

SUMMARY

Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE): a new route for cholesterol excretion

The small intestine plays a crucial role in dietary and biliary cholesterol absorption, as well as its lymphatic secretion as chylomicrons (lipoprotein exogenous way). Recently, a new metabolic pathway called TICE (trans-intestinal excretion of cholesterol) that plays a central role in cholesterol metabolism has emerged. TICE is an inducible way, complementary to the hepatobiliary pathway, allowing the elimination of the plasma cholesterol directly into the intestine lumen through the enterocytes. This pathway is poorly characterized but several molecular actors of TICE have been recently identified. Although it is a matter of debate, two independent studies suggest that TICE is involved in the anti-atherogenic reverse cholesterol transport pathway. Thus, TICE is an innovative drug target to reduce cardiovascular diseases. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Catapano AL, Chapman J, Wiklund O, Tokgozoglu AM. The new joint EAS/ESC guidelines for the management of dyslipidaemias. *Atherosclerosis* 2011 ; 217 : 3-46.
2. Couet P. Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins. *Pharmacol Ther* 2010 ; 126 : 263-78.
3. Brufau G, Groen AK, Kuipers F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 ; 31 : 1726-33.
4. Perbeniidis D, Kirchman EH, Ahrens EH. Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. *J Clin Invest* 1973 ; 52 : 2553-67.
5. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, *et al.* Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 16237-42.
6. Knuti JK, Pilsch T, Hovingo R, *et al.* Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 2005 ; 128 : 147-56.
7. Temel RE, Sawyer JK, Yu L, *et al.* Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* 2010 ; 12 : 96-102.
8. Van der Velde AE, Vrins CL, Van den Oever K, *et al.* Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007 ; 133 : 967-75.
9. Van der Veen JN, Van Dijk TH, Vrins CL, *et al.* Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 19211-9.
10. Le May C, Berger JM, Lespine A, *et al.* Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCG5. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 ; 33 : 1484-93.
11. Marshall SM, Kelley KL, Davis MA, *et al.* Reduction of VLDL secretion decreases cholesterol excretion in Niemann-Pick C1-like 1 hepatic transgenic mice. *PLoS One* 2014 ; 9 : e84408.
12. Pilsch T, Kok T, Bloks VW, *et al.* Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 33870-7.
13. Nijstad N, Gautier T, Briand F, *et al.* Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice. *Gastroenterology* 2011 ; 140 : 1045-51.

RÉFÉRENCES

14. Vrins CL, Ottenhoff R, Van den Oever K, *et al.* Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J Lipid Res* 2012 ; 53 : 2017-23.
15. Van der Velde AE, Vrins CL, Van den Oever K, *et al.* Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 ; 295 : G203-8.
16. Bura KS, Lord C, Marshall S, *et al.* Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. *J Lipid Res* 2013 ; 54 : 1567-77.
17. Vrins CL, Van der Velde AE, Van den Oever K, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2009 ; 50 : 2046-54.
18. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004 ; 303 : 1201-4.
19. Jakulj L, Vissers MN, Van Roomen CP, *et al.* Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 3625-8.
20. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 7735-8.
21. Sokolović M, Sokolović A, Van Roomen CP, *et al.* Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis: transcriptomic and lipid profiling. *J Hepatol* 2010 ; 52 : 737-44.
22. Heinemann T, Kullak-Ublick GA, Pietruck B, von Bergmann K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol* 1991 ; 40 (suppl 1) : S59-63.
23. Brufau G, Kuipers F, Lin Y, *et al.* A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS One* 2011 ; 6 : e21576.
24. Glomset, JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968 ; 9 : 155-67.
25. Xie P, Jia L, Ma Y, *et al.* Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 ; 33 : 920-5.
26. Dikkers A, Annema W, de Boer JF, *et al.* Differential impact of hepatic deficiency and total body inhibition of MTP on cholesterol metabolism and RCT in mice. *J Lipid Res* 2014 ; 55 : 816-25.
27. Cheng SH, Stanley MM. Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959 ; 101 : 223-5.
28. Stanley MM, Pineda EP, Cheng SH. Serum cholesterol esters and intestinal cholesterol secretion and absorption in obstructive jaundice due to cancer. *N Engl J Med* 1959 ; 261 : 368-73.
29. Simmonds WJ, Hofmann AF, Theodor E. Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *J Clin Invest* 1967 ; 46 : 874-90.

TIRÉS À PART
C. Le May

Discussion

L'objectif de ma thèse a été dans un premier temps de mettre en place la chirurgie bariatrique chez un modèle murin, puis d'évaluer l'impact de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol. En parallèle, nous avons étudié l'impact de la sleeve gastrectomie sur les fonctions digestives, notamment sur la perméabilité intestinale à un temps précoce.

Mise en place des modèles chirurgicaux nécessaires aux études (Article 1)

Lors de ma première année de thèse, réalisé à temps plein au sein de l'unité, j'ai pu mettre en place les modèles animaux murins de chirurgie bariatrique : la sleeve gastrectomie et le roux-en Y gastric bypass modifié. En nous referant aux travaux précédents réalisés chez la souris (Hao 2013 ; Rao 2010), nous avons pris le parti de ne pas réaliser de petite poche gastrique dans notre modèle de bypass chez la souris, augmentant la morbimortalité de la technique opératoire et de ne pas réaliser d'anastomose oesojejunale. Ces modèles ont été par la suite amélioré à l'aide d'Audrey Ayer (technicienne au sein de l'équipe) et 2 masters 2 (internes en chirurgie) : Laurence Toqué et Fréderic Borel, afin d'augmenter la survie postopératoire et tardif de ces modèles. L'ajout d'une vitaminothérapie substitutive dans le roux en y modifié ainsi que la réalisation d'une anastomose latérolatérale a permis d'augmenter le taux de survie dans les dernières expériences à presque 80% pour le roux en y modifié et 100% pour la sleeve (Peterson 2016, Muschitz 2016). La mise en place de ces modèles a été valorisée par un manuscrit avec vidéo et accepté pour publication dans le journal Jove. Une nouvelle technique a été mise en place par l'équipe lors de ma troisième année de thèse : la dérivation biliaire. Le but était de tester l'importance des modifications du métabolisme des Abs dans les effets hypocholestérolémiant des chirurgies bariatriques et notamment leurs effets sur le TICE, fort des papiers mettant en évidence leurs rôles cruciaux pour expliquer les

changements au niveau métabolique des différentes techniques de chirurgie bariatrique (Flynn 2015). Nous sommes actuellement en cours d'analyse de ces résultats. Puis nous avons développé au sein de l'équipe la mesure du transport trans intestinale, technique déjà maitrisée au sein de l'équipe (Le May 2013) mais non encore adapté après chirurgie bariatrique. Enfin, à l'aide du doctorant de l'équipe François Moreau, nous avons pu mesurer par spectrométrie de masse (plateforme dirigé par le Pr Krempf) et non plus par radioactivité le cholestérol marqué au D7 injecté par voie IV, dans le plasma, la bile, le perfusat et les fèces (Lidental 2002), ainsi que la composition en acides biliaires dans les fécès et dans le plasma (Jäntti 2014, Stelaard 1989, Suzuki 2013). Tous ces éléments ont permis par la suite de poursuivre nos différentes études.

Faisabilité, reproductibilité des protocoles et validation du modèle

Les techniques chirurgicales que nous avons employées chez la souris sont proches de celles utilisées chez l'homme, ce qui nous a conduits à observer des effets similaires chez les animaux opérés. Peu d'études ont choisi la souris comme modèle de chirurgie bariatrique. Celles-ci permettent de pouvoir utiliser par la suite des modèles génétiquement modifiés, comme par exemple des modèles plus athérogènes : souris génétiquement modifiées pour ApoE ou LDLr. Outre les différences de profil lipidique avec l'homme que nous avons discuté précédemment, le cochon et chez le rat restent les modèles de choix dans la chirurgie bariatrique du fait de leurs similitudes anatomiques avec l'homme et de leur taille (Rao 2010). La technique de la SG chez la souris est associée dans notre expérience à une faible mortalité, similaire à celle retrouvée dans la littérature (Bachmann 2013; Schlager 2011). Le RYGBP est une chirurgie délicate chez la souris, avec une mortalité de 10% dans des mains expérimentées

(cutoff de 50 souris opérées). La mortalité décrite dans la littérature pour cette procédure est de l'ordre de 20% (Hao 2013; Bruinsma 2015). Nous avons constaté une amélioration de notre taux de survie avec la pratique de cette chirurgie, nous permettant d'avoir une survie similaire voir meilleure à la fin de notre courbe d'apprentissage. Outre l'amélioration de la technique chirurgicale qui a permis de réduire la mortalité précoce du RYGBP, la supplémentation en fer et en vitamines tout au long du protocole a permis de diminuer la mortalité tardive et d'améliorer la tolérance des souris à la chirurgie (Peterson 2016, Muschitz 2016).

Nous avons observé une perte de poids après chirurgie bariatrique, dont la cinétique reproduisait celle observée chez l'homme : perte de poids initiale, plus importante après RYGBP qu'après SG, suivie d'un regain pondéral modéré (Sjöström 2004). La SG était associée à une diminution significative de la prise alimentaire chez les souris C57Bl6. Nous n'avons pas constaté de diminution significative de la prise alimentaire dans le groupe RYGBP contrairement à ce qui est constaté chez l'homme (Sjöström 2004). Ceci est probablement en rapport avec le fait que notre chirurgie n'intègre pas de diminution de la poche gastrique.

Nous avons également observé une amélioration du métabolisme glucidique, avec une diminution de l'insulinorésistance après oGTT, plus important après le RYGBP vs la Sleeve Gastrectomie. Ce résultat est en accord avec les nombreuses études sur les effets de la chirurgie bariatrique sur le DT2 (Buchwald 2009; Vest 2012).

Nos protocoles opératoires sont donc des protocoles aboutis et reproductibles, mais qui nécessitent, notamment pour le RYGBP, un entraînement conséquent (cutoff de 50 souris).

L'effet de la sleeve gastrectomie sur les fonctions digestives (Article 2)

Parallèlement à ce travail, nous avons étudié en collaboration avec l'INSERM U913 (Dr Neunlist), l'effet précoce de la sleeve gastrectomie sur la barrière intestinale.

L'obésité entraine une augmentation de l'inflammation avec une modification de la perméabilité. Différentes études animales mettent en évidence après un régime high fat diet, une augmentation de la perméabilité et donc par conséquent une augmentation du passage du LPS au niveau de la barrière intestinale et donc de l'inflammation (Cani 2008 ; De la Serre 2010 ; Suziki 2010). Ces résultats sont confirmés chez l'homme malgré le peu d'études (Brignardello 2010 ; Teixeira 2012). Par la suite, l'effet de la chirurgie sur le renforcement ou non de la barrière intestinale avec notamment l'étude de la perméabilité a été peu étudié. Seuls 2 études sont actuellement publiées, la première a mis en evidence 6 mois après RYGBP une absence de modification de celle-ci, mesurée à l'aide du ratio lactulose/mannitol (Savassi-Rocha 2014). La deuxième a mis en évidence 8 mois après RYGBP une augmentation de l'expression des proteines de jonctions serrées (Claudines 3 et 4), pouvant entrainer par la suite une diminution de la perméabilité (Casselbrant 2015). L'effet de la sleeve gastrectomie n'a jamais été étudié.

Effets de la sleeve gastrectomie sur la perméabilité et l'expression en ARMm des protéines des jonctions serrées

La SG n'induisait pas de modification du transit ni du pourcentage d'eau dans les fécès, par contre elle induisait des modifications de la perméabilité et de l'expression des protéines des jonctions serrées. En effet dans notre étude, 4 semaines après la chirurgie, la sleeve

gastrectomie induisait une diminution significative de la perméabilité para (-39%) et transcellulaire (-45%) au niveau jejunal avec une augmentation siginificative de l'expression en ARNm des protéines de jonctions sérrées : occludine (+34%) et Jam A (+31%). A l'inverse, il existait une augmentation significative de la perméabilité para (+26%) et transcellulaire (+44%) au niveau du colon sans modification de l'expression en ARNm des protéines de jonctions serrées. Notre étude est la première étudiant les effets à court terme de la SG sur ces paramètres.

Effets de la sleeve gastrectomie sur l'inflammation

Nous avons mis en évidence dans notre étude une augmentation significative du taux circulant de LPS à 4 semaines après la chirurgie (+28%), de manière très intéressante. Cette augmentation est associée à l'augmentation de l'expression en ARNm des cytokines inflammatoires au niveau du tissu adipeux inguinal : IL1β (+30%) et TNFα (+33%). Nous n'avons pas étudié l'effet sur le tissu adipeux viscéral. Il serait probablement intéressant de le réaliser dans une prochaine étude, chez l'homme. Ces résultats après chirurgie sont à mettre en parallèle avec les études réalisées à un temps plus tardif où il existe une diminution du taux de LPS après chirurgie couplée à une diminution de l'inflammation. Cet effet est dépendant des techniques avec un effet plus important du RYGBP versus la SG (Tuomi 2016).

Nos travaux mettent en évidence pour la première fois 4 semaines après une sleeve gastrectomie, une augmentation de la perméabilité para et transcellulaire ex vivo au niveau du colon, responsable d'une translocation du LPS entrainant une augmentation de l'inflammation au niveau du tissu adipeux inguinal. Malgré cette translocation et cet état pro inflammatoire, les souris opérées d'une SG, présentaient une amélioration de leurs paramètres glucidiques ainsi

qu'une perte de poids, suggérant un effet bénéfique de cet état. Dans le futur, il serait intéressant d'étudier à la fois l'effet de cet état proinflammatoire sur d'autres tissus, notamment le foie, mais aussi de réaliser ces expériences sur les souris après RYGBP. Enfin, une étude a plus long terme permettrait de comprendre le retour à la normale voire une amélioration après chirurgie bariatrique et de comprendre les mécanismes impliqués, notamment les modifications ou non de la barrière épithéliale intestinale.

Effets de la chirurgie bariatrique sur la cholestérolémie et mécanismes impliquées (Article 3)

L'originalité de ce travail a été de s'intéresser aux conséquences de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol. Comme détaillé plus tôt dans l'introduction, il existe une amélioration quelque soit la technique de la concentration plasmatique des TG après chirurgie bariatrique (Buchwald 2004 ; Carbajo 2016). Par contre, il existe une baisse de la concentration plasmatique en LDL plus importante après le RYGBP, la BD versus la sleeve gastrectomie ou encore l'anneau et une augmentation plus importante de la concentration plasmatique en HDL dans la sleeve gastrectomie versus le RYGBP (Buchwald 2004 ; Nguyen 2006 ; Bolkmans 2016 ; Aminian 2015).

L'objectif de notre travail a été dans un premier temps de confirmer ces résultats sur un modèle animal de chirurgie bariatrique. Puis dans un second temps, nous avons cherché à expliquer cette baisse de cholestérolémie par l'hypothèse d'une augmentation de l'excrétion du cholestérol, notamment via une induction du TICE mais aussi via l'augmentation ou non de l'absorption du cholestérol.

Effets de la sleeve Gastrectomie sur la cholestérolémie

Lors de la sleeve gastrectomie, à J14 postopératoire, il existait une diminution significative de la cholestérolémie entre les souris sham et sleeve. Par contre celle-ci était identique entre les souris pairfed et sleeves. Ces résultats sont en rapport avec ceux retrouvés dans les études de patients avec une nette modification de la cholestéromie après le RYGBP versus la SG (Cunha 2016). Ces données suggèrent que la baisse de la cholestérolémie serait principalement liée à la modification de la prise alimentaire après une chirurgie bariatrique. En effet, la restriction serait le mécanisme majeur des effets métaboliques de la chirurgie bariatrique (Lee 2015). L'évaluation de la modification de la prise alimentaire au cours du nycthémère après SG chez la souris pourrait être un axe de recherche permettant de mieux caractériser les déterminants de la baisse du cholestérol. Dans notre étude, il n'existait pas de modification de l'excrétion fécale de cholestérol après la sleeve gastrectomie versus pairfed et sham.

L'analyse de l'expression génique hépatique chez les souris WT après SG a mis en évidence une diminution significative de l'expression ARNm de l'HMG-CoA réductase, l'enzyme cinétiquement déterminante dans la synthèse endogène du cholestérol (Rodwell 1976). L'hypothèse d'un effet hypocholestérolémiant de la SG via une diminution de la synthèse endogène du cholestérol peut alors être avancée. De plus, l'absence de différence significative d'expression génique et protéique du LDL-R entre les groupes n'est pas en faveur d'une augmentation de l'internalisation cellulaire du LDLc via une augmentation de la synthèse de son récepteur et/ou d'une diminution de sa dégradation, via des acteurs moléculaires comme la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)(Cariou 2009).

Le RYGBP faisait significativement diminuer la cholestérolémie. En effet dès J14, il existait une baisse significative durable dans le temps, - 42%, 32.4, 37.5 et 33.7% après 2, 3, 4 et 5 semaines post chirurgie, avec un retour à la normale de la cholestérolémie de base sans régime. Cet effet n'était pas dû à la prise alimentaire, puisque les souris sham et les souris pairfed avaient exactement le même taux de cholestérolémie vs la baisse de celle-ci dans le groupe RYGBP. Ces effets marqués du RYGBP sur la baisse de la cholestérolémie sont cohérents par rapport aux études chez l'homme en terme de rémission des dyslipidémies (Puzziferri 2014; Ties 2014).

Par la suite, nous avons voulu étudier quels étaient les mécanismes impliqués dans cette baisse de cholestérolémie et dans la modification du profil lipidique, vu lors de la Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

Dans le RYGBP, nous avions une augmentation significative de l'excrétion fécale de cholestérol (+357%) et de cholestérol d'origine plasmatique (D7-cholestérol). Ceci suggère que les voies qui régulent l'élimination du cholestérol plasmatique sont significativement induites. Ainsi dans notre étude, nous avions une augmentation significative de l'excrétion trans-intestinale de cholestérol d'origine plasmatique, à la limite de la significativité pour le D7 cholestérol (p=0,11). Nous n'avions pas pu mesurer la desquamation intestinale naturelle probable (Shedding) qui peut majorer l'effet du TICE. Mais celui-ci est limité dû fait que la mesure du TICE n'avait lieu que sur 2 heures. L'amélioration de la cholestérolémie était donc due, en partie, à l'augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol via la stimulation du TICE. Pour la première fois, nous avons mis en évidence après chirurgie bariatrique, dans un modèle murin, l'augmentation de l'excrétion trans-intestinale du cholestérol. Il n'existait pas par contre

de modification de l'excrétion biliaire de cholestérol, sous réserve que sur l'ensemble des animaux celle-ci n'était pas mesurable, compte tenu de la difficulté de canuler la vésicule biliaire. Ces résultats étaient en lien avec la baisse significative d'expression en ARNm hépatique d'ABCG5/G8 (Yu 2002) et la non modification de l'expression en ARNm hépatique de CYP7A1. Il n'existait pas non plus de modification de la synthèse endogène de cholestérol (HMGcoA reductase et SREBP2), par contre les niveaux en ARNm de LDLr au niveau hépatique étaient diminués. Ces résultats étaients confirmées en analyse proteique en Western Blot. De manière suprenante, il existait une augmentation significative des niveaux de PCSK9 en ARNm au niveau hépatique et plasmatique mais aussi intestinal en ARNm, alors que le TICE est augmenté. Ces résultats vont à l'inverse de l'étude parue en 2013 par Le May *et al.*, qui mettait en évidence un rôle inhibiteur de PCSK9 pour le TICE (Le May 2013). Dans le futur, ces éléments nouveaux vont être étudiés afin de comprendre ces modifications, qui n'ont pas été caractérisés dans la littérature.

L'absorption intestinale du cholestérol diminuait aussi de façon significative de 36% après RYGBP. Cette diminution va dans le sens de ce qui est observé chez l'homme. Ainsi Pihlajamäki *et al.* retrouvent une diminution de l'absorption intestinale de cholestérol après RYGBP chez l'homme de 26% pour le sitostérol (un marqueur de l'absorption du cholestérol) un an après la chirurgie (Pihlajamäki 2000). Ces résultats sont confirmés dans d'autres études mettant en évidence une diminution de l'absorption après RYGBP (Carswell 2014 ; Blume 2012). Une des premières hypothèses est l'altération des transporteurs impliqués dans l'absorption. L'analyse de l'ARNm intestinal montre que ceux-ci n'avaient pas de modification, notamment pour NPC1L1. Il existait par contre une diminution non significative de l'expression en ARMm de CD36 et de SRB1 au niveau de l'anse alimentaire, probablement dû à un effet adpatatif de cette anse. Ces 2 transporteurs sont exprimés au niveau apical des cellules intestinalis et leurs rôles dans l'absorption du cholesterol reste encore débattu, notamment pour SRBI avec des résultats discordants entre ceux obtenus après culture

cellulaire de Caco2 (Cai 2004) et chez la souris (Mardones 2001). A l'inverse, il n'existait pas de modification de l'expression en ARNm intestinal pour ABCG5/G8. Tous ces éléments sont plutôt en faveur d'une absence d'implication des transporteurs impliqués dans l'absorption après RYGBP.

Une des autres hypothèses est la modification du flux et du profil des acides biliaires. De par l'action bénéfique de ceux-ci sur le métabolisme lipidique, glucidique et énergétique, plusieurs études ont suggéré que l'augmentation de leurs concentrations plasmatiques pouvait être à l'origine des effets antidiabétiques des chirurgies de type by-pass (Ashrafian 2011; Stefater 2012; Miras 2013). L'équipe de Gilles Mithieux a mis en évidence que l'augmentation de la concentration plasmatique des acides biliaires apparait alors comme une clé dans la compréhension des effets métaboliques bénéfiques des chirurgies de type bypass et donc comme une piste potentielle de lutte contre le diabète de type II, mais n'a pas par contre étudié l'effet sur la cholestérolémie (Goncalves 2015). De nombreuses études ont démontré que le by-pass gastrique Roux-en-Y provoque une augmentation de la concentration plasmatique d'acides biliaires (Patti 2009; Simonen 2012). Patti et al ont en effet démontré que les patients ayant bénéficié d'un RYGBP ont un taux d'acide biliaire 2 fois supérieur aux groupes contrôles et que ces taux étaient inversement corrélés à la glycémie post-prandiale, aux TG et à la TSH, alors que positivement corrélés à l'adiponectine et au GLP1 post-prandial (Patti 2009). Mais ces effets ne se limitent pas aux chirurgies malabsorptives, puisqu'après une sleeve gastrectomie il existe une modification de ce flux (Wu 2016, Belgaumkar 2016), probalement du à un effet métabolique hépatique de la sleeve (Ryan 2014).

Nous nous sommes donc intéressés au profil des acides biliaires dans le plasma et dans les fécès après RYGBP. En effet, plusieurs auteurs ont suggéré que l'élévation du taux circulant d'acides biliaires serait la conséquence d'une augmentation de leur circulation entérohépatique avec notamment une réabsorption intestinale plus efficace (Jansen 2011; Pournaras 2012; Kohli 2013). Cette hypothèse est notamment confortée par les résultats de l'interposition iléale. Dans

cette chirurgie, la bile est directement déversée au niveau du segment d'iléon interposé, *i.e.* une région spécialisée dans la réabsorption intestinale des acides biliaires. Une étude menée chez le rat a montré que ce segment s'hypertrophie après la chirurgie et conserve sa capacité à réabsorber les acides biliaires. Ces observations ont par ailleurs été corrélées à une augmentation du taux d'acides biliaires circulants. Les auteurs ont donc suggéré que l'interposition proximale d'un segment d'iléon conduirait à une réabsorption intestinale précoce et plus efficace des acides biliaires (Kohli 2010). Cependant, aucune étude testant l'hypothèse d'une modification du cycle entérohépatique des acides biliaires n'a été réalisée à ce jour dans le cadre des chirurgies de type by-pass. Dans notre étude, si l'excrétion biliaire de cholestérol n'était pas augmentée, nous avions une augmentation significative de l'excrétion d'alpha et beta-MCA (muricholic acid) dans le RYGBP au niveau des fécès, avec une augmentation significative du taux plasmatique d'acides biliaires après RYGBP. Cette différence était significative que ce soit RYGBP vs sham ou RYGBP vs pairfed pour alpha et beta-MCA. Une étude récente a mise en évidence chez le rat, une même modification du profil des acides bilaires en faveur de la forme conjuguée taurine que ce soit après sleeve ou bilidiversion (Wu 2016). Ces résultats sont retrouvés dans notre étude avec une diminution non significative, probablement par retrocontrôle de Cyp7a1 en ARNm au niveau hépatique après RYGBP. Par contre il n'existait pas de modification hépatique de l'expression en ARNm de FXR et SHP. La modification de la composition des acides biliaires a été étudiée une seule fois comme stimulateur ou non du TICE. Celle-ci a mise en évidence chez la souris, l'absence d'effets de la modification du pool et de la composition des acides biliaires chez la souris sur le TICE (Van der Velde 2008).

Ces modifications ont été aussi étudiées dans l'absorption intestinale du cholestérol. En effet dans les modèles animaux, génétiquement modifié (ex : déficience CYP7A1) ou au canal cholédoque ligaturé, l'absence d'acides biliaires réduit considérablement l'absorption intestinale du cholestérol (Voshol 2001, Ponz de Leon 1981). De plus, la nature des acides

biliaires présents au sein des micelles va avoir une influence sur l'absorption du cholestérol (Wang 2003). Wang *et al.* ont montré chez des souris une corrélation positive entre l'indice d'hydrophobicité du pool d'acides biliaires et l'absorption intestinale du cholestérol (Wang 2003). Les acides biliaires les plus hydrophobes (l'acide cholique et l'acide deoxycholique) augmentent fortement la solubilisation micellaire du cholestérol et de ce fait, favorisent son absorption. Ces modifications du pool et du profil des acides biliaires dans les fécès et dans le plasma semblent donc jouer un rôle important dans la diminution de l'absorption après RYGBP. Il serait intéressant dans le futur d'étudier si la dérivation biliaire chez les souris WT et les souris FRX Ko présentent une modification de leur métabolisme du cholestérol. Pour déterminer si les modifications des Abs observés après RYGBP et si ceux-ci étaient responsables de l'effet hypocholestériolémiant, nous avons mis au point au sein de l'unité la dérivation biliaire. Nous sommes actuellement en cours d'étude.

Lorsque nous avions analysé l'expression en ARNm au niveau intestinal, il existait une augmentation significative suprenante de l'expression de PCSK9 que ce soit dans le segment alimentaire mais aussi biliaire et commun avec une diminution de l'expression en LDLr au niveau de l'anse biliaire. Ces résultats non pas pu être confirmés en analyse protéique, n'ayant plus de matériels disponibles. Ces résultats étaient aussi retrouvés dans la littérature (Flynn 2015). Notre hypothèse est que contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, c'est-à-dire une diminution de PCSK9 qui entrainait à la suite une stimulation du TICE (Le May 2013), PCSK9 jouerait un rôle intracellulaire dans la profifération et la régénation cellulaire (Zaid 2008). Cette augmentation d'expression de PCSK9 se retrouvait également au niveau hépatique après RYGBP, ainsi qu'une augmentation du taux circulant plasmatique. Nous n'avons pas actuellement de réponse pour expliquer cette augmentation. Dans des études précédentes menées au sein de l'unité et non publiée nous avons mis en evidence chez les souris $PCSK9^{+/+}$ et $PCSK9^{-/-}$, une augmentation de manière identique de la cholestérolémie après un régime high

fat (1.69±0.19g/l in PCSK9$^{+/+}$ mice *vs* 1.58±0.17g/l in PCSK9$^{-/-}$ mice, Le May C. et al. Unpublished data). La perte rapide du phenotype de PCSK9$^{-/-}$ semble être dûe à la diminution de l'expression hépatique de PCSK9 chez les souris PCSK9$^{+/+}$, induit par le régime (l'expression en ARNm de PSCK9 hépatique et plasmatique est respectivement diminuée significativement de 70% and 55%; Le May C. et al. Unpublished data). Ces effets ont été rapportés par l'équipe de Zaid et al, chez la souris, après un régime high fat cholesterol (Zaid 2008). L'hypothèse dans notre étude est que le RYGBP restaure une expression en ARNm mais aussi en taux plasmatique de PCSK9, qui a été induite par le régime.

Concernant les segments intestinaux, ceux-ci présentaient après RYGBP une hypertrophie notamment pour l'anse alimentaire mais aussi pour l'anse commune, qui pourrait être expliquée par le rôle dans la régénération intracellulaire de PCSK9. Ces données non publiées sont en cours d'analyse mais d'autres équipes ont mis en évidence ces mêmes résultats histologique sur l'hypertrophie intestinale post chirurgie (Cavin 2016 ; Arapis 2015).

Nos résultats confirment donc ce qui a été retrouvé dans la littérature des patients opérés après chirurgie bariatrique et permettent de mieux comprendre pourquoi le RYGBP est plus efficace que la sleeve gastrectomie en termes de baisse de la cholestérolémie. Cette baisse semble donc être due à l'augmentation des voies d'élimination du cholestérol plasmatique notamment dû à l'augmentation significative de l'excrétion transintestinale du cholestérol et à la diminution significative de l'absorption intestinale du cholestérol. Les premiers résultats de la dérivation biliaire suggèrent quant à eux que cet effet est potentialisé par le rôle majeur des acides biliaires.

Une autre donnée très intéressante et qui nécessite d'être étudiée de manière plus approndie et le rôle de PCSK9 dans la régéneration cellulaire et notamment au niveau intestinale.

L'origine moléculaire responsable de l'augmentation du TICE post RYGBP reste pour le moment inconnu, il serait intéressant de déterminer si la modification du flux d'acides biliaires ou la modification histologique de l'intestion affecte le TICE.

Il existe 2 principales limites dans cette étude. Une des premières limites de notre modèle dans l'étude du cholestérol et de l'athérogénèse est que la souris WT possède une très forte proportion de HDLc et une faible proportion de LDLc contrairement à l'homme. Nous aurions pu utiliser d'autres modèles animaux comme par exemple le cochon, mais ceux-ci n'ont pas autant de modèles génétiquement modifiés pour la suite de nos travaux. Dans un futur proche, nous envisageons de réaliser ces modèles sur des souris génétiquement modifiées pour ApoE ou LDLr, avec des profils lipidique plus athérogènes. Une des autres limites de notre étude est l'absence d'un groupe contrôle sham régime standard, afin de s'assurer de l'effet propre du régime sur le métabolisme du cholestérol chez les souris WT et de l'effet sur l'expression en ARNm mais aussi en analyse protéique de PCSK9, notamment au niveau hépatique. Enfin la voie d'élimination du cholestérol étant affecté, il sera intéressant dans le futur d'étudier plus précisement le RCT dans ces modèles de chirurgie, afin de voir son implication et l'effet de la chirurgie sur celui-ci.

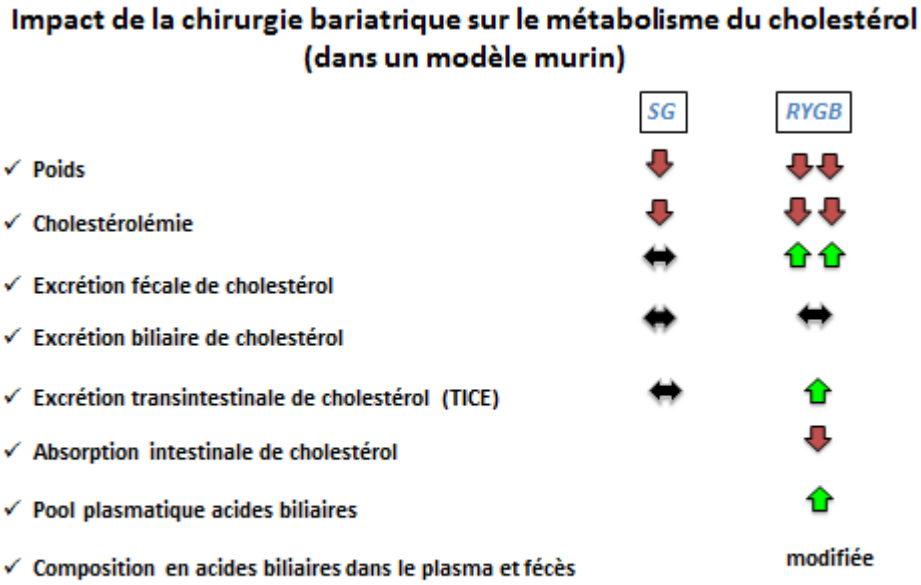


Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets sur le métabolisme du cholestérol, dans un modèle murin, de la sleeve gastrectomie (SG) et du Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB)

Conclusion et Perspectives

En conclusion, nous avons démontré que la souris était entre nos mains un modèle chirurgical valable pour étudier les effets métaboliques des chirurgies bariatriques. Nous avons confirmé l'existence d'une amélioration des paramètres lipidiques après ces chirurgies. En effet, notre travail a mis en évidence une baisse de la chlolestérolémie après RYGBP plus importante qu'après une SG. Le RYGBP induisait une augmentation significative de l'excrétion fécale du cholestérol via une stimulation de l'excrétion transintestinale du cholestérol et une réduction de la capacité intestinale à absorber le cholestérol. Dans ce contexte, et en élargissant dans la prise en charge de l'hypercholestérolémie, le TICE semble être une cible thérapeutique intéressante. Une des limites de notre modèle dans l'étude du cholestérol et de l'athérogénèse est que la souris WT possède une très forte proportion de HDLc et une faible proportion de LDLc contrairement à l'homme. Dans un futur proche, nous envisageons de réaliser ces modèles sur des souris génétiquement modifiées pour ApoE ou LDLr. Une des autres limites de notre étude est l'absence d'un groupe contrôle sham régime standard, afin de s'assurer de l'effet propre du régime sur le métabolisme du cholestérol chez les souris WT, notamment au niveau hépatique.

Parallèlement à ce travail, nous avons étudié en collaboration avec l'INSERM U913 (Dr Neunlist), l'effet précoce de la sleeve gastrectomie sur la barrière intestinale. La sleeve induit des modifications de la perméabilité et de l'expression des protéines des jonctions serrées. Ces changements accroissent la translocation du LPS dans le plasma, favorisant ainsi un état pro-inflammatoire adipocytaire. L'effet tardif de la sleeve sur la perméabilité intestinale reste à être déterminé.

En parallèle, nos modèles chirurgicaux nous ont permis de réaliser des collaborations avec notamment l'équipe du Pr Besnard (Dijon) pour étudier l'impact de la perte de poids

induite par la chirurgie bariatrique sur le comportement alimentaire et notamment sur les bourgeons du goût (le goût du gras) chez des sujets et des animaux obèses avant et après chirurgie bariatrique (Human fat taste 2), mais aussi avec l'équipe d'Angers porté par le Dr Geraldine Gascouin sur l'impact de la chirurgie bariatrique sur les descendances, en étudiant notamment la stéatose hépatique et sur les modifications épigénétiques induites sur les souriceaux de souris opérées de chirurgie bariatrique.

Bibliographie

- Abdullah A, Amin F, Stoelwinder J, Tanamas S, Wolfe R, Barendregt J and Peeters A. (2014).Estimating the risk of cardiovascular disease using an obese-years metric. BMJ Open. 17;4:e005629. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005629.
- Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet. 34:154-6.
- Abumrad NA, Davidson NO. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. Physiol Rev. 92:1061-85. doi: 10.1152/physrev.00019.2011.
- Adams S, Salhab M, Hussain ZI, Miller G, Leveson S. (2013). Obesity-related hypertension and its remission following gastric bypass surgery - a review of the mechanisms and predictive factors. Blood Press. 2013 22:131-7. doi: 10.3109/08037051.2012.749570.
- Afshar S, Kelly SB, Seymour K, Woodcock S, Werner AD, Mathers JC. (2016). The Effects of Bariatric Procedures on Bowel Habit.Obes Surg. 2016 Feb 19. [Epub ahead of print]
- AIM-HIGH Investigators, Boden, W.E., Probstfield, J.L., Anderson, T., Chaitman, B.R., Desvignes-Nickens, P., Koprowicz, K., McBride, R., Teo, K., and Weintraub, W. (2011). Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. N. Engl. J. Med. 365, 2255–2267.
- Alrefai WA, Gill RK. (2007). Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. Pharm Res. 24:1803-23.
- Altieri MS, Yang J, Telem DA, Meng Z, Frenkel C, Halbert C, Talamini M, Pryor AD. (2016). Lap band outcomes from 19,221 patients across centers and over a decade within the state of New York. Surg Endosc. 30:1725-32. doi: 10.1007/s00464-015-4402-8.
- Altmann S, Davis H, Zhu L, Yao x, Hoos L, Tetzloff G, S. Lyer P, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N and Graziano L. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science. 303; 5661 : 1201-1204.

- Abumrad NA, Davidson NO. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. Physiol Rev. 92:1061-85. doi: 10.1152/physrev.00019.2011.
- Aminian A, Brethauer SA, Andalib A, Punchai S, Mackey J, Rodriguez J, Rogula T, Kroh M, Schauer PR. (2016). Can Sleeve Gastrectomy "Cure" Diabetes? Long-term Metabolic Effects of Sleeve Gastrectomy in Patients With Type 2 Diabetes. Ann Surg. 18. [Epub ahead of print]
- Aminian A., Zelisko A., Kirwan J.P., Brethauer S.A. and Schauer P.R (2015). Exploring the impact of bariatric surgery on high density lipoprotein. Surg. Obes. Relat. Dis. Off. J. Am. Soc. Bariatr. Surg.11,238–247.
- Angelin B, Nilsell K, Einarsson K. (1986). Ursodeoxycholic acid treatment in humans: effects on plasma and biliary lipid metabolism with special reference to very low density lipoprotein triglyceride and bile acid kinetics. Eur J Clin Invest. 1986 16:169-77.
- Aouba A, Péquignot F, Le Toullec A, Jougla E. (2007) Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire n°35-36, 308-314.
- Appachi S, Kashyap SR.(2013).'Adiposopathy' and cardiovascular disease: the benefits of bariatric surgery. Curr Opin Cardiol. 28:540-6.
- Araghi MH, Jagielski A, Neira I, Brown A, Higgs S, Thomas GN, Taheri S. (2013). The complex associations among sleep quality, anxiety-depression, and quality of life in patients with extreme obesity.Sleep. 1;36:1859-65. doi: 10.5665/sleep.3216.
- Arapis K, Cavin JB, Gillard L, Cluzeaud F, Lettéron P, Ducroc R, Le Beyec J, Hourseau M, Couvelard A, Marmuse JP, Le Gall M, Bado A. (2015). Remodeling of the residual gastric mucosa after roux-en-y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats. PLoS One. 30;10:e0121414. doi: 10.1371/journal.pone.0121414. eCollection 2015.
- Arble DM, Sandoval DA, Seeley RJ. (2015). Mechanisms underlying weight loss and metabolic improvements in rodent models of bariatric surgery.Diabetologia. 58:211-20. doi: 10.1007/s00125-014-3433-3. Review.
- Ashrafian, H., Athanasiou, T., Li, J.V., Bueter, M., Ahmed, K., Nagpal, K., Holmes, E., Darzi, A., Bloom, S.R. (2011). Diabetes resolution and hyperinsulinaemia after metabolic Roux-en-Y gastric bypass. Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes. 12, e257–272.

- Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, Dallal GE, Horvath KV, Ai M, Stanhope KL, Austrheim-Smith I, Wolfe BM, Ali M, Havel PJ. (2010). Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. The Journal of Lipid Research. 51:2405 12.
- Bachmann, R., Meile, T., Lange, J., Widmayer, P., Königsrainer, A., and Küper, M.A. (2013). Surgical Technique of a Vertical Sleeve Gastrectomy in Mice. J. Invest. Surg. *26*, 261–265.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI.(2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2;101:15718-23.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. (1998). The stomach is a source of leptin. Nature. 394:790-3.
- Balint JA, Fried MB, Imai C. Ileal uptake of oleic acid: evidence for adaptive response to high fat feeding. (1980). Am J Clin Nutr. 33:2276-80.
- Ballem N, Yellumahanthi K, Wolfe M, Wesley MM, Clements RH. (2009). Gastrointestinal symptom improvement after Roux-en-Y gastric bypass: long-term analysis. Surg Obes Relat Dis. 5:553-8. doi: 10.1016/j.soard.2008.11.013.
- Barron J, Frame B, Bozalis JR. (1969). A shunt operation for obesity. Dis Colon Rectum. 12:115-9.
- Barros R, Moreira P, Padrão P, Teixeira VH, Carvalho P, Delgado L, Moreira A. (2016). Obesity increases the prevalence and the incidence of asthma and worsens asthma severity. Clin Nutr. 9. S0261-5614 : 30158-3. doi: 10.1016/j.clnu.2016.06.023. [Epub ahead of print]
- Bartlett MA, Mauck KF, Daniels PR. (2015). Prevention of venous thromboembolism in patients undergoing bariatric surgery. Vasc Health Risk Manag.17;11:461-77.
- Barter PJ, Nicholls SJ, Kastelein JJ, Rye KA. (2015). Is Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition an Effective Strategy to Reduce Cardiovascular Risk? CETP Inhibition as a Strategy to Reduce Cardiovascular Risk: The Pro Case. Circulation. 4;132:423-32. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014025.
- Barter P. (2000). CETP and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20:2029-31.
- Batsis JA, Mackenzie TA, Lopez-Jimenez F, Bartels SJ. (2015). Sarcopenia, sarcopenic obesity, and functional impairments in older adults: National Health and Nutrition

Examination Surveys 1999-2004. Nutr Res.35:1031-9. doi: 10.1016/j.nutres.2015.09.003.

- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. Nature. 8;418:650-4.
- Baud G, Daoudi M, Hubert T, Raverdy V, Pigeyre M, Hervieux E, Devienne M, Ghunaim M, Bonner C, Quenon A, Pigny P, Klein A, Kerr-Conte J, Gmyr V, Caiazzo R, Pattou F. (2016). Bile Diversion in Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates Sodium-Dependent Glucose Intestinal Uptake.Cell Metab. 8;23:547-53. doi: 10.1016/j.cmet.2016.01.018.
- Bays H, Kothari S, Azagury D, Morton J, Nguyen N, Jones P, Jacobson T, Cohen D, Orringer C, Westman EC, Horn DB, Scinta W, Primack C. (2016). Lipids and bariatric procedures Part 2 of 2: scientific statement from the American Society for Metabolic and Bariatric Surgery (ASMBS), the National Lipid Association (NLA), and Obesity Medicine Association (OMA). Surg Obes Relat Dis. 12:468-95. doi: 10.1016/j.soard.2016.01.007.
- Bays H, Jones P, Jacobson T, Cohen D, Orringer C, Kothari S, Azagury D, Morton J, Nguyen N, Westman E, Horn D, Scinta W, Primack C. (2016). Lipids and bariatric procedures part 1 of 2: Scientific statement from the National Lipid Association, American Society for Metabolic and Bariatric Surgery, and Obesity Medicine Association: FULL REPORT. J Clin Lipidol. 10:33-57. doi: 10.1016/j.jacl.2015.12.002.
- Beccuti G, Pannain S. (2011). Sleep and obesity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 14:402-412.
- Befort CA, Nazir N, Perri MG. (2012). Prevalence of obesity among adults from rural and urban areas of the United States: findings from NHANES (2005-2008). J Rural Health. 28:392-397.
- Beitner MM, Ren-Fielding CJ, Fielding GA. (2016).Reducing complications with improving gastric band design. Surg Obes Relat Dis.12:150-6.
- Belachew M, Jacqet P, Lardinois F, Karler C. (1993). Vertical Banded Gastroplasty vs Adjustable Silicone Gastric Banding in the Treatment of Morbid Obesity: a Preliminary Report. Obes Surg. 3:275-8.
- Belachew M, Zimmermann JM. (2002). Evolution of a paradigm for laparoscopic adjustable gastric banding.Am J Surg. 184:21S-25S.7.

- Belgaumkar AP, Vincent RP, Carswell KA, Hughes RD, Alaghband-Zadeh J, Mitry RR, le Roux CW, Patel AG. (2016). Changes in Bile Acid Profile After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy are Associated with Improvements in Metabolic Profile and Fatty Liver Disease. Obes Surg.26:1195-202. doi: 10.1007/s11695-015-1878-1.
- Bell GD, Lewis B, Petrie A, Dowling RH. (1973). Serum lipids in cholelithiasis: effect of chenodeoxycholic acid therapy. Br Med J. 8;3:520-3.
- Benetti A, Del Puppo M, Crosignani A, Veronelli A, Masci E, Frigè F, Micheletto G, Panizzo V, Pontiroli AE. (2013). Cholesterol metabolism after bariatric surgery in grade 3 obesity: differences between malabsorptive and restrictive procedures. Diabetes Care. 36:1443-7. doi: 10.2337/dc12-1737.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. Science. 1;290:1771-5.
- Bernstein AM, Bloom DE, Rosner BA, Franz M, Willett WC. (2010). Relation of food cost to healthfulness of diet among US women. The American journal of clinical nutrition. 92:1197-1203.
- Berthoud HR, Zheng H. (2012). Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and weight loss. Physiol Behav 107: 527-32.
- Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. (2014). Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5·24 million UK adults. Lancet 384/755-765 http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1016/S0140-6736(14)60892-8.
- Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Coméra C, Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Tercé F, Collet X. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. J Biol Chem. 17;281:7214-9.
- Blanchard C, Moreau F, Cariou B, Le May C. (2014). Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE): a new route for cholesterol excretion. Med Sci (Paris). 2014 30:896-901. doi: 10.1051/medsci/20143010017. Review. French.
- Blom DJ, Hala T, Bolognese M, Lillestol MJ, Toth PD, Burgess L, Ceska R, Roth E, Koren MJ, Ballantyne CM, Monsalvo ML, Tsirtsonis K, Kim JB, Scott R, Wasserman SM, Stein EA; DESCARTES Investigators. (2014). A 52-Week Placebo-Controlled Trial of Evolocumab in Hyperlipidemia. *N Engl J Med* 2014;doi:10.1056/NEJMoa1316222

- Blomain ES, Dirhan DA, Valentino MA, Kim GW, Waldman SA. (2013). Mechanisms of Weight Regain following Weight Loss. ISRN Obes. 2013:210524.
- Blume CA, Boni CC, Casagrande DS, Rizzolli J, Padoin AV, Mottin CC. (2012). Nutritional profile of patients before and after Roux-en-Y gastric bypass: 3-year follow-up. Obes Surg. 22:1676-85. doi: 10.1007/s11695-012-0696-y.
- Blundell JE, Cooling J. (2000). Routes of obesity: phenoypes, food choices and activity. Brit J Nutr 83: S33-S8.
- Boden G. (2003). Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 111:121-4.
- Bolckmans R, Himpens J. (2016). Long-term (>10 Yrs) Outcome of the Laparoscopic Biliopancreatic Diversion With Duodenal Switch. Ann Surg. 13. [Epub ahead of print]
- Bosner M, Lange L, Stenson W and Ostlund R. (1999).Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, 40 ;2: 302-308.
- Bouchoucha M, Fysekidis M, Julia C, Airinei G, Catheline JM, Reach G, Benamouzig R. (2015). Functional Gastrointestinal Disorders in Obese Patients. The Importance of the Enrollment Source. Obes Surg. 25:2143-52. doi: 10.1007/s11695-015-1679-6.
- Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. (2010). Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function.Aliment Pharmacol Ther. 32:1307-14. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04475.
- Brinton E, Triscari J, Brudi P, Chen E, Johnson-Levonas A, Sisk C, Ruck R, MacLean A, Maccubbin D, Mitchel Y.(2016). Effects of extended-release niacin/laropiprant on correlations between apolipoprotein B, LDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol in patients with type 2 diabetes. Lipids Health Dis. 12;15:116. doi: 10.1186/s12944-016-0282-8.
- Brolin RE, Bradley LJ, Wilson AC, Cody RP. (2000). Lipid risk profile and weight stability after gastric restrictive operations for morbid obesity.J Gastrointest Surg. 2000 Sep-Oct;4(5):464-9.
- Brown N, Read N, Richardson A, Rumsey R and Bogentoft C (1990). Characteristics of lipid substances activating the ileal brake in the rat. Gut 31, 1126-1129.
- Brown WA, Egberts KJ, Franke-Richard D, Thodiyil P, Anderson ML, O'Brien PE. (2013).Erosions after laparoscopic adjustable gastric banding: diagnosis and management. Ann Surg.257:1047-52.

- Bruckert E, Giral P, Tellier P. (2003). Perspectives in cholesterol-lowering therapy. The roleof ezetimibe, a new selective inhibitor of intestinal cholesterol absorption. Circulation 107: 3124-8.
- Brufau, G., Albert, K., Groen., Kuipers, F. (2011) Reverse cholesterol transport revisited contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 31, DOI : 10.1161/ATVBAHA.108.181206.
- Bruinsma, B.G., Uygun, K., Yarmush, M.L., and Saeidi, N. (2015). Surgical models of Roux-en-Y gastric bypass surgery and sleeve gastrectomy in rats and mice. Nat. Protoc. 10, 495–507.
- 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, Hayden MR. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. J Clin Invest. 116:1052-62.
- Buchwald H, Buchwald JN. (2002). Evolution of operative procedures for the management of morbid obesity 1950-2000. Obes Surg.12:705-17.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K.(2004). Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 292:1724-37.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Sledge I. (2007). Trends in mortality in bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. Surgery. 142:621-32; discussion 632-5. Review.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. (2009). Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. Am J Med. 122:248-256.e5. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.09.041. Review.
- Buchwald H, Oien DM. (2009). Metabolic/bariatric surgery Worldwide 2008. Obes Surg. 19:1605-11. doi: 10.1007/s11695-009-0014-5.
- Buettner R, Parhofer K, Woenckhaus M, Wrede C, Kunz-Schughart L, Schölmerich J and Bollheimer L. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. J. Mol. Endocrinol 36, 485-501.
- Bullen, T.F., Forrest, S., Campbell, F., Dodson, A.R., Hershman, M.J., Pritchard, D.M., Turner, J.R., Montrose, M.H. and Watson, A.J. (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. Lab Invest 86, 1052-1063.

- Burcelin R, Garidou L, Pomie C. (2012). Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. Sem Immunol 24: 67–74.
- Cai L, Eckhardt ER, Shi W, Zhao Z, Nasser M, de Villiers WJ, van der Westhuyzen DR. (2004). Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. J Lipid Res. 45:253-62.
- Caiazzo R, Lassailly G, Leteurtre E, Baud G, Verkindt H, Raverdy V, Buob D, Pigeyre M, Mathurin P, Pattou F. (2014). Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. Ann Surg. 260:893-8; discussion 898-9. doi: 10.1097/SLA.0000000000000945.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.(2003). N Engl J Med. 24;348:1625-38.
- Cani P, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck A, Delzenne N and Burcelin. (2008) Changes in Gut microbiota Control Metabolic Endotoxemia Induced Inflammation in High Fat Diet induced Obesity and Diabetes in Mice. Diabetes 57, 1470-1481.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 56:1761-72.
- Cannon W.B. (1912). Peristalsis, segmentation and the myenteric reflex. American Journal of Physiology. Legacy Content 30, 114-128.
- Carbajo MA, Fong-Hirales A, Luque-de-León E, Molina-Lopez JF, Ortiz-de-Solórzano J. (2016). Weight loss and improvement of lipid profiles in morbidly obese patients after laparoscopic one-anastomosis gastric bypass: 2-year follow-up. Surg Endosc. 2016 Jun 17. [Epub ahead of print]
- Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, Hirabara SM, Castoldi A, Vieira P, Camara NO, Curi R, Carvalheira JB, Saad MJ. (2011). Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. PLoS Biol 9: e1001212.
- Cariou B, Staels B. (2006). The expanding role of the bile acid receptor FXR in the small intestine. J Hepatol. 44:1213-5. Review.
- Cariou, B., Ouguerram, K., Zaïr, Y., Guerois, R., Langhi, C., Kourimate, S., Benoit, I., Le May, C., Gayet, C., Belabbas, K., Dufernez F, Chétiveaux M, Tarugi P, Krempf M,

Benlian P, Costet P. (2009). PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29, 2191–2197.

- Cariou B, Si-Tayeb K, Le May C. (2015). Role of PCSK9 beyond liver involvement. Curr Opin Lipidol. 26:155-61. doi: 10.1097/MOL.0000000000000180. Review.
- Carlos L. J. Vrins, Astrid E. van der Velde, Karin van den Oever, Johannes H. M. Levels, Stephane Huet, Ronald P. J. Oude Elferink and Folkert Kuipers. (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. J Lipid Res, 50, 2046-2054.
- Carswell KA, Vincent RP, Belgaumkar AP, Sherwood RA, Amiel SA, Patel AG, le Roux CW. (2014). The effect of bariatric surgery on intestinal absorption and transit time. Obes Surg. 24:796-805. doi: 10.1007/s11695-013-1166-x.
- Carswell KA, Belgaumkar AP, Amiel SA, Patel AG. (2016). A Systematic Review and Meta-analysis of the Effect of Gastric Bypass Surgery on Plasma Lipid Levels. Obesity Surgery. 26:843 55.
- Casselbrant A, Elias E, Fändriks L, Wallenius V. (2015). Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after Roux-en-Y gastric bypass surgery.Surg Obes Relat Dis. 11:45-53. doi: 10.1016/j.soard.2014.05.009.
- Cavin JB, Couvelard A, Lebtahi R, Ducroc R, Arapis K, Voitellier E, Cluzeaud F, Gillard L, Hourseau M, Mikail N, Ribeiro-Parenti L, Kapel N, Marmuse JP, Bado A, Le Gall M. (2016). Differences in Alimentary Glucose Absorption and Intestinal Disposal of Blood Glucose After Roux-en-Y Gastric Bypass vs Sleeve Gastrectomy.Gastroenterology. 150:454-64.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.009. Epub 2015 Oct 23.
- Cavin JB, Voitellier E, Cluzeaud F, Kapel N, Marmuse JP, Chevallier JM, Msika S, Bado A, Le Gall M. (2016). Malabsorption and intestinal adaptation after one anastomosis gastric bypass compared with Roux-en-Y gastric bypass in rats.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 1;311:G492-500. doi: 10.1152/ajpgi.00197.2016.
- Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes?. Nat Rev Immunol. 10:735-44. doi: 10.1038/nri2850.
- Chapman MJ. (2006). Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. Pharmacol Ther. 111:893-908. Review.

- Chaturvedi, L.S., Marsh, H.M., Shang, X., Zheng, Y., Basson, M.D. (2007). Repetitive deformation activates focal adhesion kinase and ERK mitogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells through Src and Rac1. J Biol Chem 282, 14-28.
- Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientos-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. (2010). Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. Cochrane Database Syst Rev. 20:CD007340. doi: 10.1002/14651858.CD007340.pub2. Review.
- Cheng SH, Stanley MM. (1959). Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patientswith complete common bile duct obstruction. Proc Soc Exp Biol Med 101:223-225.
- Chevallier JM, Zinzindohoué F, Douard R, Blanche JP, Berta JL, Altman JJ, Cugnenc PH. (2004). Complications after laparoscopic adjustable gastric banding for morbid obesity: experience with 1,000 patients over 7 years. Obes Surg. 14:407–414.
- Chevrot M, Passilly-Degrace P, Ancel D, Bernard A, Enderli G, Gomes M, Robin I, Issanchou S, Vergès B, Nicklaus S, Besnard P. (2014). Obesity interferes with the orosensory detection of long-chain fatty acids in humans. Am J Clin Nutr. 99:975-83. doi: 10.3945/ajcn.113.077198.
- Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. Nat Genet. 37:161-5.
- Corfield, A.P., Myerscough, N., Longman, R., Sylvester, P., Arul, S., Pignatelli, M. (2000). Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract. new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. Gut 47, 589-594.
- Costet P, Krempf M, Cariou B. (2008). PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. Trends Biochem Sci. 33:426-34. doi: 10.1016/j.tibs.2008.06.005. Review.
- Courcoulas AP, Christian NJ, Belle SH, Berk PD, Flum DR, Garcia L, Horlick M, Kalarchian MA, King WC, Mitchell JE, Patterson EJ, Pender JR, Pomp A, Pories WJ, Thirlby RC, Yanovski SZ, Wolfe BM; Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Consortium. (2013). Weight change and health outcomes at 3 years after bariatric surgery among individuals with severe obesity.JAMA. 11;310:2416-25. doi: 10.1001/jama.2013.280928.
- Courcoulas AP, Goodpaster BH, Eagleton JK, Belle SH, Kalarchian MA, Lang W, Toledo FG, Jakicic JM. (2014). Surgical vs medical treatments for type 2 diabetes

mellitus: a randomized clinical trial.JAMA Surg. 149:707-15. doi: 10.1001/jamasurg.2014.467.

- Covasa M, Grahn J and Ritter R. (2000). Reduced hindbrain and enteric neuronal response to intestinal oleate in rats maintained on high fat diet. Auton Neurosci 84, 818.
- Cunha FM, Oliveira J, Preto J, Saavedra A, Costa MM, Magalhães D, Lau E, Bettencourt-Silva R, Freitas P, Varela A, Carvalho D. (2016). The Effect of Bariatric Surgery Type on Lipid Profile: An Age, Sex, Body Mass Index and Excess Weight Loss Matched Study. Obesity Surgery. 2016;26:1041 7.
- Cunningham K, Daly J, Horowitz M and Read N. (1991). Gastrointestinale adaptation to diets of differing fat composition in human volunteers. Gut 32, 483-486.
- Daniele G, Guardado Mendoza R, Winnier D, Fiorentino TV, Pengou Z, Cornell J, Andreozzi F, Jenkinson C, Cersosimo E, Federici M, Tripathy D, Folli F. (2014). The inflammatory status score including IL-6, TNF-alpha, osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in Type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol 51: 123–131.
- Dargent J. (2015). Esophageal dilatation after laparoscopic adjustable gastric banding: definition and strategy.Obes Surg. 15:843-848.
- Debnath M, Agrawal S, Agrawal A, Dubey GP. (2016). Metaflammatory responses during obesity: Pathomechanism and treatment. Obes Res Clin Pract. 10:103-13. doi: 10.1016/j.orcp.2015.10.012. Review.
- De La Serre C, Ellis C, Lee J, Hartmann A, Rutledge J and Raybould H. (2010). Propensity to high fat diet induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol 299, G440-448.
- DelValle J, Yamada T. (1990). Amino acids and amines stimulate gastrin release from canine antral G-cells via different pathways. J Clin Invest. ;85:139-43.
- Desseyn JL, Gouyer V, Gottrand F. (2015). Custom modification in vivo of mucus properties: proof of concept and potential applications.Med Sci. 31(:1063-6. doi: 10.1051/medsci/20153112005.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchampt A, Bäckhed F, Mithieux G. (2016). Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis.Cell Metab. 12;24:151-7. doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.013.
- Detournay B, Fagnani F, Phillippo M, Pribil C, Charles MA, Sermet C, Basdevant A, Eschwège E. (2000). Obesity morbidity and health care costs in France: an analysis of

the 1991-1992 Medical Care Household Survey. Int J Obes Relat Metab Disord. 24:151-5.

- Dhana K, Nano J, Ligthart S, Peeters A, Hofman A, Nusselder W, Dehghan A, Franco OH. Obesity and Life Expectancy with and without Diabetes in Adults Aged 55 Years and Older in the Netherlands: A Prospective Cohort Study. (2016). PLoS Med. 19;13:e1002086. doi: 10.1371/journal.pmed.1002086.
- Dhasarathy A, Roemmich JN, Claycombe KJ. (2016). Influence of maternal obesity, diet and exercise on epigenetic regulation of adipocytes. Mol Aspects Med. 2016 Nov 4. pii: S0098-2997(16)30024-3. doi: 10.1016/j.mam.2016.10.003. [Epub ahead of print] Review. No abstract available.
- Dikkers A, Annema W, de Boer JF, Iqbal J, Hussain MM, Tietge UJ. (2014). Differential impact of hepatic deficiency and total body inhibition of MTP on cholesterol metabolism and RCT in mice. J Lipid Res. 55:816-25. doi: 10.1194/jlr.M042986.
- Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, Jobin C, Lund PK. (2010). High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. PLoS One 16;5:e12191. doi: 10.1371/journal.pone.0012191.
- Dixon JB, Chuang LM, Chong K, Chen SC, Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Lee WJ. (2013). Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 36:20-26.
- Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P, Abumrad NA. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. J Clin Invest. 115:1290-7.
- Drover VA, Nguyen DV, Bastie CC, Darlington YF, Abumrad NA, Pessin JE, London E, Sahoo D, Phillips MC. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. J Biol Chem. 9;283:13108-15. doi: 10.1074/jbc.M708086200.
- Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, Staels B, Lestavel S. (2006). Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine.Biochem Biophys Res Commun. 24;340:1259-63.
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. Histochem Cell Biol 130, 1-20.

- Egerod KL, Engelstoft MS, Lund ML, Grunddal KV, Zhao M, Barir-Jensen D, Nygaard EB, Petersen N, Holst JJ, Schwartz TW. (2015). Transcriptional and Functional Characterization of the G Protein-Coupled Receptor Repertoire of Gastric Somatostatin Cells. Endocrinology. 156:3909-23.
- Elmadfa I, Meyer AL. (2012).Diet quality, a term subject to change over time. Int J Vitam Nutr Res. 82:144-147.
- Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. (2007). A high-fat meal induces low-gradeendotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. Am J Clin Nutr.86:1286-92.
- Fabre AC, Malaval C, Ben Addi A, Verdier C, Pons V, Serhan N, Lichtenstein L, Combes G, Huby T, Briand F, Collet X, Nijstad N, Tietge UJ, Robaye B, Perret B, Boeynaems JM, Martinez LO. (2010). P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. Hepatology. 52:1477-83. doi: 10.1002/hep.23897.
- Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O, Lackey D, Yoshihara E, Perino A, Jacinto S, Lukasheva Y, Atkins AR, Khvat A, Schnabl B, Yu RT, Brenner DA, Coulter S, Liddle C, Schoonjans K, Olefsky JM, Saltiel AR, Downes M, Evans RM. (2015). Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. Nat Med. 21:159-65. doi: 10.1038/nm.3760.
- Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. (2012). NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. Gut Liver. 6:149-71.
- Feinle C, D'Amato M and Read N. (1996). Cholecystokinin-A receptors modulate gastric sensory and motor responses to gastric distension and duodenal lipid. Gastroenterology 110, 1379-1385.
- Flegal K, Kit B, Orpana H, Graubard B. (2013). Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories a systematic review and meta-analysis. JAMA, 309 , pp. 71–82.
- Flynn CR, Albaugh VL, Cai S, Cheung-Flynn J, Williams PE, Brucker RM, Bordenstein SR, Guo Y, Wasserman DH, Abumrad NN. (2015). Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. Nat Commun.21;6:7715. doi: 10.1038/ncomms8715.
- Forster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. Histochem Cell Biol 130, 55-70.

- Fraser R, Dobbs BR, Rogers GW. (1995). Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. Hepatology. 21:863-74.
- Frey, A., Giannasca, K.T., Weltzin, R., Giannasca, P.J., Reggio, H., Lencer, W.I., and Neutra, M.R. (1996). Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal cells. Implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. J Expl Med 184, 1045-1059.
- Fu Y, Xia Y, Yi H, Xu H, Guan J, Yin S. (2016). Meta-analysis of all-cause and cardiovascular mortality in obstructive sleep apnea with or without continuous positive airway pressure treatment.Sleep Breath. 8. [Epub ahead of print]
- Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Mariat D, Corthier G, Doré J, Henegar C, Rizkalla S, Clément K. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. Diabetes. 59:3049-57. doi: 10.2337/db10-0253.
- Gaillard D, Passilly-Degrace P, Besnard P. (2008). Molecular mechanisms of fat preference and overeating. Ann N Y Acad Sci. 1141:163-75. doi: 10.1196/annals.1441.028.
- Garrod, D.R., Merritt, A.J. and Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. Curr Opin Cell Biol 14, 537-545.
- Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, Nadolsky K, Pessah-Pollack R, Plodkowski R; Reviewers of the AACE/ACE Obesity Clinical Practice Guidelines. (2016). American Association of Clincal Endocrinologists and American College of Endocrinology Comprehensive Clinical Practice Guidelines for Medical Care of patients with obesity executive summary. Complete Guidelines available at https://www.aace.com/publications/guidelines.Endocr Pract. 22:842-84. doi: 10.4158/EP161356.ESGL
- Genser L, Poitou C, Brot-Laroche É, Rousset M, Vaillant JC, Clément K, Thenet S, Leturque A. (2016). Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?] Med Sci. 32:461-9. doi: 10.1051/medsci/20163205012.
- Giannoulis EL, Barry RE. (1982). Bioassay of cholecystokinin. Gut. 23:146-9.
- Gioiello A, Cerra B, Mostarda S, Guercini C, Pellicciari R, Macchiarulo A. (2014). Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid x receptor: molecular determinants for bile acid binding and receptor modulation. Curr Top Med Chem. 14:2159-74. Review.

- Gylling H, Hallikainen M, Kolehmainen M, Toppinen L, Pihlajamäki J, Mykkänen H, Agren JJ, Rauramaa R, Laakso M, Miettinen TA. (2007). Cholesterol synthesis prevails over absorption in metabolic syndrome. Transl Res. 149:310-6.
- Glomset, J.A. (1968). J. Lipid Res. 9, 155-167.
- Goldstein JL, Brown MS. (2001). Molecular medicine. The cholesterol quartet. Science. 2001 May 18;292:1310-2.
- Goncalves D, Barataud A, De Vadder F, Vinera J, Zitoun C, Duchampt A, Mithieux G. (2015). Bile Routing Modification Reproduces Key Features of Gastric Bypass in Rat. Ann Surg. 262:1006-15. doi: 10.1097/SLA.0000000000001121.
- Gordon T, Castelli W, Hjortland M, Kannel W and Dawber W. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. Am. J. Med. 62;5:707-714.
- Grenkowitz T, Kassner U, Wühle-Demuth M, Salewsky B, Rosada A, Zemojtel T, Hopfenmüller W, Isermann B, Borucki K, Heigl F, Laufs U, Wagner S, Kleber ME, Binner P, März W, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I. (2016). Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 26;253:88-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.037. [Epub ahead of print]
- Griffen WO, Jr., Young VL, Stevenson CC. (1977). A prospective comparison of gastric and jejunoileal bypass procedures for morbid obesity. Ann Surg. 186:500-9.
- Gronnier C, Piessen G, Leteurtre E, Van Seuningen I, Mariette C. (2015). Suitability of surgically induced chronic reflux in rats for studying esophageal carcinogenesis. Ann Surg. 261:e140-1. doi: 10.1097/SLA.0000000000000474.
- Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A. (2003). Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. Diabetes. 52:1664-72.
- Gummesson A, Carlsson LM, Storlien LH, Bäckhed F, Lundin P, Löfgren L, Stenlöf K, Lam YY, Fagerberg B, Carlsson B. (2011). Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women.Obesity (Silver Spring). 19:2280-2. doi: 10.1038/oby.2011.251.
- Griffo E, Cotugno M, Nosso G, Saldalamacchia G, Mangione A, Angrisani L, Rivellese AA, Capaldo B. (2016). Effects of Sleeve Gastrectomy and Gastric Bypass on Postprandial Lipid Profile in Obese Type 2 Diabetic Patients: a 2-Year Follow-up. Obes Surg. 26:1247-53. doi: 10.1007/s11695-015-1891-4.

- Grong E, Kulseng B, Arbo IB, Nord C, Eriksson M, Ahlgren U, Mårvik R. (2016). Sleeve gastrectomy, but not duodenojejunostomy, preserves total beta-cell mass in Goto-Kakizaki rats evaluated by three-dimensional optical projection tomography. Surg Endosc. 30:532-42. doi: 10.1007/s00464-015-4236-4.
- Gwynne RM, Bornstein JC. (2007). Mechanisms underlying nutrient-induced segmentation in isolated guinea pig small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 292:G1162-72.
- Hall TC, Pellen MG, Sedman PC, Jain PK. (2010). Preoperative factors predicting remission of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity. Obesity surgery. 20:1245-1250.
- Hao Z, Zhao Z, Berthoud HR, Ye J. (2013). Development and verification of a mouse model for Roux-en-Y gastric bypass surgery with a small gastric pouch. PLoS One.8:e52922. doi: 10.1371/journal.pone.0052922.
- Hao Z, Mumphrey MB, Townsend RL, Morrison CD, Münzberg H, Ye J, Berthoud HR. (2016). Body Composition, Food Intake, and Energy Expenditure in a Murine Model of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery.Obes Surg.18. [Epub ahead of print]
- Hall KD, Hammond RA, Rahmandad H. (2014). Dynamic interplay among homeostatic, hedonic, and cognitive feedback circuits regulating body weight. Am J Public Health. 104:1169-1175.
- Hauser H, Dyer JH, Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G, Phillips MC. (1998). Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. Biochemistry. 22;37:17843-50.
- Heddle R, Dent J, Read N, Houghton L, Toouli J, Horowitz M, Maddern G and Downton J. (1988). Antropyloroduodenal moto responses to intraduodenal lipid infusion in healthly volunteers. Am J Physiol 254, G671-679.
- Heddle R, Dent J, Toouli J and Read N. (1988). Topography and measurement of pyloric pressure waves and tone in humans. Am J Physiol 255, G490-497.
- Hess, D.S., and Hess, D.W. (1998). Biliopancreatic diversion with a duodenal switch. Obes. Surg. *8*,267–282.
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. (2012). Energy balance and obesity. Circulation. 126(1):126-132.

- Hodge RJ, Nunez DJ. (2016). Therapeutic potential of Takeda-G-protein-receptor-5 (TGR5) agonists. Hope or hype? Diabetes Obes Metab. 18:439-43. doi: 10.1111/dom.12636.
- Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. N Engl J Med. 9;359:1577-89. doi: 10.1056/NEJMoa0806470.
- Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. (2007). Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends Biochem Sci. 32:71-7. Review.
- Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, Bashmakov Y, Hammer RE. (2003). Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver.J Biol Chem. 19;278:36652-60.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259: 87–91.
- Hunt J and Stubbs. (1975). The volume and energy content of meals as determinents of gastric emptying. J Physiol. 113, 157-168.
- Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. J Lipid Res. 50:1509-20. doi: 10.1194/jlr.R900007-JLR200. Review.
- https://www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2014/pdfs/pr229_F.pdf
- Iqbal J, Hussain MM. (2005). Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. J Lipid Res. 46:1491-501.
- Insull W. (2006). Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. South Med J. 99:257-73.
- Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga Ji, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Yazaki Y, Yamada N. (1996). Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. J Biol Chem. 13;271:22422-7.
- Jaikanth C, Gurumurthy P, Cherian KM, Indhumathi T. (2013). Emergence of omentin as a pleiotropic adipocytokine. Exp Clin Endocrinol Diabetes 121:377–383.
- Jakulj, L., Vissers, M.N., van Roomen, C.P., van der Veen, J.N., Vrins, C.L.J., Kunne, C., Stellaard, F., Kastelein, J.J.P., and Groen, A.K. (2010). Ezetimibe stimulates faecal

neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. FEBS Lett. 584, 3625–3628.

- Jakulj L, van Dijk TH, Freark de Boer J, Kootte RS, Schonewille M, Paalvast Y, Boer T, Bloks VW, Boverhof R, Nieuwdorp M, Beuers UH, Stroes ES, Groen AK. (2016). Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. Cell Metab. 2. pii: S1550-4131(16)30507-1. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.001. [Epub ahead of print]
- Jansen, P.L.M., van Werven, J., Aarts, E., Berends, F., Janssen, I., Stoker, J., and Schaap, F.G. (2011). Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. Dig. Dis. Basel Switz. 29, 48–51.
- Jantaratnotai N, Mosikanon K, Lee Y, McIntyre RS. (2016). The interface of depression and obesity. Obes Res Clin Pract. 4. pii: S1871-403X(16)30069-2. doi: 10.1016/j.orcp.2016.07.003. [Epub ahead of print] Review.
- Jung HR1, Turner SM, Neese RA, Young SG, Hellerstein MK. (1999). Metabolic adaptations to dietary fat malabsorption in chylomicron-deficient mice. Biochem J. 15;343 Pt 2:473-8.
- Junien C, Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS. (2005). Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. Med Sci (Paris). 21:396-404. Review. French.
- Katz LN, Pick R, Stamler J. (1954). Cholesterol-lipid-lipoprotein metabolism and atherogenesis.Mod Concepts Cardiovasc Dis. 23:239-42.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. J Biol Chem. 14;278:9435-40.
- Keitel V, Häussinger D. (2011). TGR5 in the biliary tree. Dig Dis. 29:45-7. doi: 10.1159/000324127. Review.
- Kelly TN, Bazzano LA, Ajami NJ, He H, Zhao J, Petrosino JF, Correa A, He J. (2016). Gut Microbiome Associates With Lifetime Cardiovascular Disease Risk Profile Among Bogalusa Heart Study Participants. Circ Res. 2016 Aug 9. pii: CIRCRESAHA.116.309219. [Epub ahead of print]
- Kim CS, Nam JY, Park JS, Kim DM, Yoon SJ, Ahn CW, Lim SK, Kim KR, Lee HC, Huh KB, Cha BS (2004). The correlation between insulin resistance and the visceral fat to skeletal muscle ratio in middle-aged women. Yonsei Med J. 45:469-78.
- Kim J and Egan J. (2008). The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. Pharmacol Rev, 60; 4: 470-512.

- Kohli R, Kirby M, Setchell KD, Jha P, Klustaitis K, Woollett LA, Pfluger PT, Balistreri WF, Tso P, Jandacek RJ, Woods SC, Heubi JE, Tschoep MH, D'Alessio DA, Shroyer NF, Seeley RJ. (2010). Intestinal adaptation after ileal interposition surgery increases bile acid recycling and protects against obesity-related comorbidities.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 299:G652-60. doi: 10.1152/ajpgi.00221.2010.
- Kohli R, Setchell KD, Kirby M, Myronovych A, Ryan KK, Ibrahim SH, Berger J, Smith K, Toure M, Woods SC, Seeley RJ. (2013). A surgical model in male obese rats uncovers protective effects of bile acids post-bariatric surgery. Endocrinology 154:2341-51. doi: 10.1210/en.2012-2069.
- Kruit, JK., Plosch, T., Havinga, R., Boverhof, R., Groot, PH., Groen, AK., and Kuipers, F. (2005) Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. Gastroenterology, 128, 147–156.
- Kuzmak LI. (1991). A Review of Seven Years' Experience with Silicone Gastric Banding.Obes Surg. 1:403-8.
- Jäntti SE, Kivilompolo M, Ohrnberg L, Pietiläinen KH, Nygren H, Orešič M, Hyötyläinen T. (2014). Quantitative profiling of bile acids in blood, adipose tissue, intestine, and gall bladder samples using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 406:7799-815. doi: 10.1007/s00216-014-8230-9.
- Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. J Clin Gastroenterol 10 Suppl 1, S72-77.
- Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, Tran H, Egger JR, Colarusso A, Kovack B, Bawa B, Koshy N, Lee H, Yapp K, Olivan B. (2008). Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet onglucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 2479–2485.
- Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD. (2006). Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. J Clin Invest. 116:2995-3005.
- Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, Raverdy V, Leteurtre E, Dharancy S, Louvet A, Romon M, Duhamel A, Pattou F, Mathurin P. (2015). Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients.Gastroenterology. 149:379-88; quiz e15-6. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.014.

- Laugerette F, Vors C, Peretti N, Michalski MC. (2011). Complex links between dietary lipids,endogenous endotoxins and metabolic inflammation. Biochimie. 93:39-45.
- Laugerette F, Vors C, Géloën A, Chauvin MA, Soulage C, Lambert-Porcheron S, Peretti N, Alligier M, Burcelin R, Laville M, Vidal H, Michalski MC. (2011). Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. J Nutr Biochem. 22:53-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.11.011.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP and Besnard P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. J Clin Invest 115: 3177-84.
- Laurenius A, Taha O, Maleckas A, Lönroth H, Olbers T. (2010). Laparoscopic biliopancreatic diversion/duodenal switch or laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for super-obesity-weight loss versus side effects. Surg Obes Relat Dis. 6:408-14. doi: 10.1016/j.soard.2010.03.293.
- Lazzati A, Polliand C, Porta M, Torcivia A, Paolino LA, Champault G, Barrat C. (2011). Is fixation during gastric banding necessary? A randomized clinical study.Obes Surg 21:1859-63.
- Lee WJ, Yu PJ, Wang W, Chen TC, Wei PL, Huang MT (2005). Laparoscopic Roux-en-Y versus mini-gastric bypass for the treatment of morbid obesity: a prospective randomized controlled clinical trial. Ann Surg. 242:20-8.
- Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT; Lancet Physical Activity Series Working Group. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. Lancet. 21;380:219-29. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61031-9.
- Lee WJ, Almulaifi A. (2015). Recent advances in bariatric/metabolic surgery: appraisal of clinical evidence. J Biomed Res. 29:98-104. doi: 10.7555/JBR.28.20140120. Review.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. Physiol Rev. 89:147-91. doi: 10.1152/physrev.00010.2008.
- Leinaar E, Alamian A, Wang L. (2016). A systematic review of the relationship between asthma, overweight, and the effects of physical activity in youth. Ann Epidemiol. 26:504-510. Review.
- Lenard NR, Berthoud HR. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. Obesity 16 Suppl 3:S11-22.

- Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chétiveaux M, Jarry A, Comera C, Collet X, Kuipers F, Krempf M, Cariou B, Costet P. (2009). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29:684-90. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181586.
- Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, Hussain MM, Collet X, Cariou B, Costet P. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 33:1484-93. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300263.
- Li Z, Zhang HY, Lv LX, Li DF, Dai JX, Sha O, Li WQ, Bai Y, Yuan L. (2010).Roux-en-Y gastric bypass promotes expression of PDX-1 and regeneration of beta-cells in Goto-Kakizaki rats. World J Gastroenterol. 14;16:2244-51.
- Li C, Gao M, Zhang W, Chen C, Zhou F, Hu Z, Zeng C. (2016). Zonulin Regulates Intestinal Permeability and Facilitates Enteric Bacteria Permeation in Coronary Artery Disease. Sci Rep. 29;6:29142. doi: 10.1038/srep29142.
- Lindenthal B, Aldaghlas TA, Holleran AL, Sudhop T, Berthold HK, Von Bergmann K, Kelleher JK. (2002). Isotopomer spectral analysis of intermediates of cholesterol synthesis in human subjects and hepatic cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282:E1222-30.
- Liu Y, Lei L, Wang X, Ma KY, Li YM, Wang L, Man SW, Huang Y, Chen ZY. (2015). Plasma cholesterol-raising potency of dietary free cholesterol versus cholesteryl ester and effect of β-sitosterol. Food Chem. 15;169:277-82. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.123.
- Lopez D. (2008). Inhibition of PCSK9 as a novel strategy for the treatment of hypercholesterolemia.Drug News Perspect. 21:323-30. doi: 10.1358/dnp.2008.21.6.1246795.
- Lyon HN, Hirschhorn JN. (2005). Genetics of common forms of obesity: a brief overview. The American journal of clinical nutrition. 82:215S-217S.
- Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. J Clin Invest. 116:1102-9.
- Madara, J.L. (1990). Maintenance of the macromolecular barrier cell extrusion sites in intestinal epithelium, physiological rearrangement of tight junctions. J Membr Biol 116, 177-184.

- Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH, Nguyen NT, Li Z, Mojica WA, Hilton L, Rhodes S, Morton SC, Shekelle PG. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. (2005). Ann Intern Med. 142:547-59.
- Malhotra A, White DP. (2002) Suitability of surgically induced chronic reflux in rats for studying esophageal carcinogenesis. Lancet. 20;360:237-45. Review.
- Marceau P, Hould FS, Simard S, Lebel S, Bourque RA, Potvin M, Biron S. (1998). Biliopancreatic diversion with duodenal switch. World J Surg. 22:947-54.
- Marceau P, Biron S, Bourque RA, Potvin M, Hould FS, Simard S. (1993). Biliopancreatic Diversion with a New Type of Gastrectomy.Obes Surg. 3:29-35.
- Marceau P, Hould FS, Simard S, Lebel S, Bourque RA, Potvin M, Biron S. (1998). Biliopancreatic diversion with duodenal switch.World J Surg. 22:947-54.
- Mardones P, Quiñones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE, Rigotti A. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. J Lipid Res. 42:170-80.
- Martinez KB, Pierre JF, Chang EB. (2016). The Gut Microbiota: The Gateway to Improved Metabolism. Gastroenterol Clin North Am. 45:601-614. doi: 10.1016/j.gtc.2016.07.001. Review.
- Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR).Biochem Biophys Res Commun. 15;298:714-9.
- Mason EE, Ito C. Gastric bypass. (1969). Ann Surg. 170:329-39.
- Mason EE. Vertical banded gastroplasty for obesity. (1982). Arch Surg. 117:701-6.
- Mcintyre N, Holdswoth C and Turner D. New interpretation of oral glucose tolerance. Lancet, 2; 7349:20-21.
- Medzhitov R, Horng T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. Nat Rev Immunol 9: 692–703.
- Mencarelli A, Renga B, D'Amore C, Santorelli C, Graziosi L, Bruno A, Monti MC, Distrutti E, Cipriani S, Donini A, Fiorucci S. (2013). Dissociation of intestinal and hepatic activities of FXR and LXRα supports metabolic effects of terminal ileum interposition in rodents. Diabetes. 62:3384-93. doi: 10.2337/db13-0299.
- Miller K, Hell E. (1999). Laparoscopic adjustable gastric banding: a prospective 4-year follow-up study.Obes Surg. 9:183-7.

- Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Nanni G, Castagneto M, Bornstein S, Rubino F. (2015). Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. Lancet. 5;386:964-73. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00075-6.
- Miras, A.D., Jackson, R.N., Jackson, S.N., Goldstone, A.P., Olbers, T., Hackenberg, T., Spector, A.C., le Roux, C.W. (2012). Gastric bypass surgery for obesity decreases the reward value of a sweet-fat stimulus as assessed in a progressive ratio task. Am. J. Clin. Nutr. 96, 467–473.
- Miras AD, le Roux CW. (2013). Mechanisms underlying weight loss after bariatric surgery. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 10:575-84. doi: 10.1038/nrgastro.2013.119. Review.
- Mognol P, Chosidow D, Marmuse JP. (2005). Laparoscopic sleeve gastrectomy as an initial bariatric operation for high-risk patients: initial results in 10 patients. Obes Surg. 15:1030-3.
- Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfenas Rde C. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. Br J Nutr. 108:801-9. doi: 10.1017/S0007114512001213.
- Muc M, Mota-Pinto A, Padez C. (2016). Association between obesity and asthma - epidemiology, pathophysiology and clinical profile.Nutr Res Rev. 12:1-8.
- Müller-Stich BP1, Senft JD, Warschkow R, Kenngott HG, Billeter AT, Vit G, Helfert S, Diener MK, Fischer L, Büchler MW, Nawroth PP. (2015). Surgical versus medical treatment of type 2 diabetes mellitus in nonseverely obese patients: a systematic review and meta-analysis. Ann Surg. 261:421-9. doi: 10.1097/SLA.0000000000001014.
- Muschitz C, Kocijan R, Haschka J, Zendeli A, Pirker T, Geiger C, Müller A, Tschinder B, Kocijan A, Marterer C, Nia A, Muschitz GK, Resch H, Pietschmann P. (2016). The Impact of Vitamin D, Calcium, Protein Supplementation, and Physical Exercise on Bone Metabolism After Bariatric Surgery: The BABS Study. J Bone Miner Res. 31:672-82. doi: 10.1002/jbmr.2707.
- Myronovych A, Kirby M, Ryan KK, Zhang W, Jha P, Setchell KD, Dexheimer PJ, Aronow B, Seeley RJ, Kohli R. (2014). Vertical sleeve gastrectomy reduces hepatic steatosis while increasing serum bile acids in a weight-loss-independent manner.Obesity 22:390-400. doi: 10.1002/oby.20548.

- Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. J Biol Chem. 6;282:19493-501.
- Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P. (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. Gastroenterology. 131:1197-207.
- NEEL JV. (1962). Human population genetics, 1961. Acta Genet Med Gemellol 11:263-8.
- Nguyen NT, Varela E, Sabio A, Tran CL, Stamos M, Wilson SE. (2006). Resolution of hyperlipidemia after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. J Am Coll Surg. 203:24-9.
- Nguyen DV, Drover VA, Knopfel M, Dhanasekaran P, Hauser H, Phillips MC. (2009). Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. J Lipid Res. 50:2235-44. doi: 10.1194/jlr.M900036-JLR200.
- Nieset, J.E., Redfield, A.R., Jin, F., Knudsen, K.A., Johnson, K.R. and Wheelock, M.J. (1997). Characterisation of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and bata-catenin/phakoglobin. J Cell Sci 110, 1013-1022.
- Niessen CM. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function.J Invest Dermatol. 127:2525-32. Review.
- Nigatu Y, Reijneveld S, de Jonge P, van Rossum E, Bültmann U. (2016). The Combined Effects of Obesity, Abdominal Obesity and Major Depression/Anxiety on Health-Related Quality of Life: the LifeLines Cohort Study.PLoS One. 11;11:e0148871. doi: 10.1371/journal.pone.0148871.
- Nijstad N, Gautier T, Briand F, Rader DJ, Tietge UJ. (2011). Biliary sterol secretion is required for functional reverse cholesterol transport in mice. Gastroenterology 140:1043-51. doi: 10.1053/j.gastro.2010.11.055.
- Nilsson S. Research contributions of Eskil Kylin. (2001). Sven Med Tidskr. 5:15-28.
- Obépi 2012. www.roche.fr/content/dam/roche_france/fr_FR/doc/obepi_2012.pdf
- Ocón Bretón J, Pérez Naranjo S, Gimeno Laborda S, Benito Ruesca P, García Hernández R. (2005). Effectiveness and complications of bariatric surgery in the treatment of morbid obesity. Nutr Hosp.20:409-14.

- Oh TJ, Ahn CH, Cho YM. (2016). Contribution of the distal small intestine to metabolic improvement after bariatric/metabolic surgery: Lessons from ilealtransposition surgery.J Diabetes Investig. 71:94-101. doi: 10.1111/jdi.12444. Review.
- Oikawa S, Yamashita S, Nakaya N, Sasaki J, Kono S. (2016). Effect of Fenofibrate and Ezetimibe Combination Treatment on Lipid (EFECTL) Study Investigators. Efficacy and Safety of Long-term Coadministration of Fenofibrate and Ezetimibe in Patients with Combined Hyperlipidemia: Results of the EFECTL Study. J Atheroscler Thromb. [Epub ahead of print]
- Onyike CU, Crum RM, Lee HB, Lyketsos CG, Eaton WW. (2003). Is obesity associated with major depression? Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Epidemiol. 15;158:1139-47.
- Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q., and Chen, C. (2005) Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. Q J Med, 98, 845–856.
- Ooi EM, Ng TW, Chan DC, Watts GF. (2009). Plasma markers of cholesterol homeostasis in metabolic syndrome subjects with or without type-2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 85:310-6. doi: 10.1016/j.diabres.2009.06.003.
- Parker HE, Wallis K, le Roux CW, Wong KY, Reimann F, Gribble FM. (2012). Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion. Br J Pharmacol. 165:414-23. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01561.x.
- Partinen M., Jamieson A., Guilleminault C. (1988). Longterm outcome for obstructive sleep apnea syndrome patients mortality. Chest 94, 1200-1204.
- Patrone V, Vajana E, Minuti A, Callegari ML, Federico A, Loguercio C, Dallio M, Tolone S, Docimo L, Morelli L. (2016). Postoperative Changes in Fecal Bacterial Communities and Fermentation Products in Obese Patients Undergoing Bilio-Intestinal Bypass. Front Microbiol. 23;7:200. doi: 10.3389/fmicb.2016.00200. eCollection 2016.
- Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, Badman MK, Maratos-Flier E, Mun EC, Pihlajamaki J, Auwerx J, Goldfine AB. (2009). Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism.Obesity (Silver Spring).17:1671-7. doi: 10.1038/oby.2009.102.
- Payne JH, Dewind LT, Commons RR. (1963). Metabolic Observations in Patients withJejunocolic Shunts.Am J Surg. 106:273-89.
- Payne JH, DeWind LT. Surgical treatment of obesity. (1969). Am J Surg. 118:141-7.

- Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L; NEDCOM, the Netherlands Epidemiology and Demography Compression of Morbidity Research Group. (2003). Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis.Ann Intern Med. 7;138:24-32.
- Penney NC, Kinross J, Newton RC, Purkayasha S. (2015). The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: a systematic review. Int J Obes 39: 1565–1574.
- Perides G, Laukkarinen JM, Vassileva G, Steer MI. (2010). Biliary acute pancreatitis in mice is mediated by the G-protein-coupled cell surface bile acid receptor Gpbar. Gastroenterology138*:* 715–725.
- Pertsemlidis, D., Kirchman, EH., and Ahrens, EH., Jr. (1973). Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. J Clin Invest, 52, 2353-2367.
- Peterson LA, Zeng X, Caufield-Noll CP, Schweitzer MA, Magnuson TH, Steele KE. (2016). Vitamin D status and supplementation before and after bariatric surgery: a comprehensive literature review. Surg Obes Relat Dis. 12:693-702. doi: 10.1016/j.soard.2016.01.001. Review.
- Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot P, Pineau T, Besnard P and Niot I. (2007). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postpandrail triglyceride levels in mouse. J Lipid Res 48, 278-287.
- Pihlajamäki J, Grönlund S, Simonen M, Käkelä P, Moilanen L, Pääkkönen M, Pirinen E, Kolehmainen M, Kärjä V, Kainulainen S, Uusitupa M, Alhava E, Miettinen TA, Gylling H. (2010). Cholesterol absorption decreases after Roux-en-Y gastric bypass but not after gastric banding. Metabolism. 59:866-72. doi: 10.1016/j.metabol.2009.10.004.
- Phillips C, Perry I. (2015). Lipoprotein particle subclass profiles among metabolically healthy and unhealthy obese and non-obese adults: does size matter? Atherosclerosis. 242:399-406. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.040.
- Podolsky DK. (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. Am J Physiol. 277:G495-9. Review.
- Poirier P, Auclair A. (2014). Role of bariatric surgery in diabetes. Curr Cardiol Rep. 16:444.

- Ponz de Leon M, Loria P, Lori R and Carulli N. (1981). Cholesterol absorption in cirrhosis: the role of total and individual bile acid pool size. *Gastroenterology. 80;* 6 : 1428-1437.
- Porez G, Prawitt J, Gross B, Staels B. (2012). Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease.J Lipid Res. 53:1723-37. doi: 10.1194/jlr.R024794.
- Potten, C.S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. Am J Physiol 273, G253-257.
- Potten, C.S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353, 821-830.
- Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganolipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D, Bekker JH, Ghatei MA, Bloom SR, Walters JR, Welbourn R, le Roux CW. (2012). The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. Endocrinology. 153:3613-9. doi: 10.1210/en.2011-2145.
- Potoczna N, Harfmann S, Steffen R, Briggs R, Bieri N, Horber FF. (2008). Bowel habits after bariatric surgery.Obes Surg. 18:1287-96. doi: 10.1007/s11695-008-9456-4.
- Prochnow, N. and Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. Histochem Cell Biol 130, 71-77.
- Puzziferri N, Roshek TB, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. (2014). Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. JAMA. 3;312:934-42. doi: 10.1001/jama.2014.10706.
- Ramracheya RD, McCulloch LJ, Clark A, Wiggins D, Johannessen H, Olsen MK, Cai X, Zhao CM, Chen D, Rorsman P. (2016). PYY-Dependent Restoration of Impaired Insulin and Glucagon Secretion in Type 2 Diabetes following Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. Cell Rep. 3;15:944-50. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.091.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Itsrole in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet.1:785-9.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. Obesity 14:529-644. Review.
- Rao RS, Rao V, Kini S. (2010). Animal models in bariatric surgery--a review of the surgical techniques and postsurgical physiology. Obes Surg. 20:1293-305. doi: 10.1007/s11695-010-0135-x. Review.

- Ravid Z, Bendayan M, Delvin E, Sane AT, Elchebly M, Lafond J, Lambert M, Mailhot G, Levy E. (2008). Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 29:G873-85. doi: 10.1152/ajpgi.90376.2008.
- Read N, McFarlane A, Kinsman R, Bates T , Blackhall N, Farrar G Hall J, Moss G, Morris A and O'Neill. (1984). Effect of infusion of nutrient solutions into the ileum on gastrointestinal transit and plasma levels of neurotensin and enteroglucagon. Gastroenterology 86, 274-280.
- Reaven GM. Banting lecture 1988. (1988). Role of insulin resistance in human disease.Diabetes. 37:1595-607.
- Rehfield P1, Kopes-Kerr C, Clearfield M. (2013). The evolution or revolution of statin therapy in primary prevention: where do we go from here? Curr Atheroscler Rep. 2013 15:298. doi: 10.1007/s11883-012-0298-0.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science. 1;289:1524-9.
- Reyes C, Leyland K, Peat G, Cooper C, Arden NK, Prieto-Alhambra D. (2016). Association Between Overweight and Obesity and Risk of Clinically Diagnosed Knee, Hip, and Hand Osteoarthritis: A Population-Based Cohort Study. Arthritis Rheumatol. 68:1869-75. doi: 10.1002/art.39707.
- Rhee NA, Wahlgren CD, Pedersen J, Mortensen B, Langholz E, Wandall EP, Friis SU, Vilmann P, Paulsen SJ, Kristiansen VB, Jelsing J, Dalbøge LS, Poulsen SS, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. (2015). Effect of Roux-en-Y gastric bypass on the distribution and hormone expression of small-intestinal enteroendocrine cells in obese patients with type 2 diabetes. Diabetologia. 58:2254-8. doi: 10.1007/s00125-015-3696-3.
- Rizzello M, De Angelis F, Campanile FC, Silecchia G. (2012). Effect of gastrointestinal surgical manipulation on metabolic syndrome: a focus on metabolic surgery. Gastroenterol Res Pract. 2012:670418.
- Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L., and Mitschelen, J.J. (1976). Regulation of HMG-CoA reductase. Adv. Lipid Res. 14, 1–74.
- Rohde U, Sonne DP, Christensen M, Hansen M, Brønden A, Toräng S, Rehfeld JF, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. (2016). Cholecystokinin-Induced Gallbladder Emptying

and Metformin Elicit Additive Glucagon-Like Peptide-1 Responses.J Clin Endocrinol Metab. 101:2076-83. doi: 10.1210/jc.2016-1133.

- Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. Circulation. 17;125:1905-19. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589. Review.
- Rubino F, Marescaux J. (2004). Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. Ann Surg. 239:1-11.
- Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. (2006). The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg*. 244:741-749.
- Rubino F, Nathan D, Eckel R. (2016). Metabolic surgery in the treatment algorithm for type 2 diabetes: a joint statement by the international diabetes organizations, Diabetes Cares, 2016; 39: 861-877.
- Rumilla K, Erickson LA, Service FJ, Vella A, Thompson G, Grant C, Lloyd R. (2009). Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis: histologic features and growth factor expression. Mod Pathol. 22:239-45.
- Rutledge R. (2011). The mini-gastric bypass: experience with the first 1,274 cases.Obes Surg. 11:276-80.
- Rutledge R, Deitel M, Kular KS. (2016). Regarding Liver Function 1 Year After Omega Loop Gastric Bypass.Obes Surg. 30. [Epub ahead of print]
- Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, Wilson-Pérez HE, Sandoval DA, Kohli R, Bäckhed F, Seeley RJ. (2014). FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. Nature. 8;509:183-8. doi: 10.1038/nature13135.
- Saad MJ, Santos A, Prada PO. (2016). Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. Physiology (Bethesda). 31:283-93. doi: 10.1152/physiol.00041.2015.
- Saber AA, Elgamal MH, McLeod MK. (2008). Bariatric surgery: the past, present, and future.Obes Surg. 18:121-8.

- Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, Diniz Mde F, Sanches SR, da Cunha AS, Ferrari Mde L, Torres HO, Maciente BA, Ataliba GS, Araújo PM, Guerra TB, Balbino IK. (2014). Changes in intestinal permeability after Roux-en-Y gastric bypass. Obes Surg. 24:184-90. doi: 10.1007/s11695-013-1084-y.
- Schauer PR, Bhatt DL, Kashyap SR. (2014). Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes. N Engl J Med. 14;371:682. doi: 10.1056/NEJMc1407393.
- Schiavon C, Drager L, Bortolotto L, Amodeo C, Ikeoka D, Berwanger O, Cohen R. (2016). The Role of Metabolic Surgery on Blood Pressure Control.Curr Atheroscler Rep. 18:50. doi: 10.1007/s11883-016-0598-x.
- Schlager, A., Khalaileh, A., Mintz, Y., Gazala, M.A., Globerman, A., Ilani, N., Rivkind, A.I., Salpeter, S., Dor, Y., and Zamir, G. (2011). A mouse model for sleeve gastrectomy: Applications for diabetes research. Microsurgery 31, 66–71.
- Schwenke D and Carew T (1989). Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. ,*Arteriosclerosis* 9:908-918.
- Scopinaro N, Gianetta E, Civalleri D, Bonalumi U, Bachi V. (1979). Bilio-pancreatic bypass for obesity: II. Initial experience in man. Br J Surg. 66:618-20.
- Scott HW, Jr., Sandstead HH, Brill AB, Burko H, Younger RK. (1971). Experience with a new technic of intestinal bypass in the treatment of morbid obesity. Ann Surg. 174:560-72.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation.Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 100:928-33.
- Sepe V, Distrutti E, Fiorucci S, Zampella A. (2015). Farnesoid X receptor modulators (2011 - 2014): a patent review. Expert Opin Ther Pat. 25:885-96. doi: 10.1517/13543776.2015.1045413. Review.
- Shelness GS, Sellers JA. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. Curr Opin Lipidol. 12:151-7. Review.
- Shibata HR, MacKenzie JR, Long RC. (1967). Metabolic effects of controlled jejunocolicbypass. Arch Surg. 95:413-28.
- Simmonds WJ, Hofmann AF, Theodor E. (1967). Absorption of cholesterol from a micellarsolution: intestinal perfusion studies in man. J Clin Invest 46:874-890.

- Silecchia G, Boru C, Pecchia A, Rizzello M, Casella G, Leonetti F, Basso N. (2006). Effectiveness of laparoscopic sleeve gastrectomy (first stage of biliopancreatic diversion with duodenal switch) on co-morbidities in super-obese high-risk patients. Obes Surg. 161:1138-44.
- Simonen M, Dali-Youcef N, Kaminska D, Venesmaa S, Käkelä P, Pääkkönen M, Hallikainen M, Kolehmainen M, Uusitupa M, Moilanen L, Laakso M, Gylling H, Patti ME, Auwerx J, Pihlajamäki J. (2012). Conjugated bile acids associate with altered rates of glucose and lipid oxidation after Roux-en-Y gastric bypass. Obes Surg. 22:1473-80. doi: 10.1007/s11695-012-0673-5.
- Simons P, Kummer J, Luiken J, Boon J. (2011). Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem* 113: 839-43.
- Simopoulos AP. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med. 233:674-88. doi: 10.3181/0711-MR-311. Review.
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. Cell. 15;102:731-44.
- Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H; Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. (2004). Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery.N Engl J Med. 351:2683-93.
- Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Sjöström CD, Karason K, Wedel H, Ahlin S, Anveden Å, Bengtsson C, Bergmark G, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Karlsson J, Lindroos AK, Lönroth H, Narbro K, Näslund I, Olbers T, Svensson PA, Carlsson LM. (2012). Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. JAMA. 4;307:56-65. doi: 10.1001/jama.2011.1914.
- Sperry, WM. (1927) A study of the relationship of the bile to the fecal lipids with special reference to certain problems of sterol metabolism. J Biol Chem, 71, 351-378.
- Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, Osto E, Kouach M, Daoudi M, Vallez E, Raverdy V, Goossens JF, Descat A, Doytcheva P, Hubert T, Lutz TA, Lestavel S, Staels B, Pattou F, Tailleux A. (2016). Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. Int J Obes. 40:1260-7. doi: 10.1038/ijo.2016.46.

- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. Circulation 98: 2088-93.
- Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, Wilson-Pérez HE, Hofmann SM, Jandacek R, Tso P, Woods SC, Seeley RJ. (2011). Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. Gastroenterology. 141:939-949.e1-4. doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.008.
- Stefater, M.A., Wilson-Pérez, H.E., Chambers, A.P., Sandoval, D.A., and Seeley, R.J. (2012). All bariatric surgeries are not created equal: insights from mechanistic comparisons. Endocr. Rev. 33,595–622.
- Stellaard F, Langelaar SA, Kok RM, Jakobs C. (1989). Determination of plasma bile acids by capillary gas-liquid chromatography-electron capture negative chemical ionization mass fragmentography. J Lipid Res. 30:1647-52.
- Stenholm S, Head J, Kivimäki M, Kawachi I, Aalto V, Zins M, Goldberg M, Zaninotto P, Magnuson Hanson L, Westerlund H, Vahtera J. (2016). Smoking, physical inactivity and obesity as predictors of healthy and disease-free life expectancy between ages 50 and 75: a multicohort study.Int J Epidemiol. 2. pii: dyw126. [Epub ahead of print]
- Stoeckel L, Weller R, Cook E, Twieg D, Knowlton R, Cox. (2008). Widespread reward system activation in obese women in response to picture of high calorie foods Neuroimage 41: 636-47.
- Stroes E, Colquhoun D, Sullivan D, Civeira F, Rosenson RS, Watts GF, Bruckert E, Cho L, Dent R, Knusel B, Xue A, Scott R, Wasserman SM, Rocco M; GAUSS-2 Investigators. (2014). Anti-PCSK9 Antibody Effectively Lowers Cholesterol in Patients with Statin Intolerance: The GAUSS-2 Randomized, Placebo-controlled Phase 3 Clinical Trial of Evolocumab. *J Am Coll Cardiol*. 17;63:2541-8. doi: 10.1016/j.jacc.2014.03.019.
- Sturm, A. and Dignass, A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 14, 348-353.
- Suchy FJ, Ananthanarayanan M. (2006). Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 43 Suppl 1:S10-6.
- Sudhop T1, Reber M, Tribble D, Sapre A, Taggart W, Gibbons P, Musliner T, von Bergmann K, Lütjohann D. (2009). Changes in cholesterol absorption and cholesterol synthesis caused by ezetimibe and/or simvastatin in men. J Lipid Res. 50:2117-23. doi: 10.1194/jlr.P900004-JLR200.

- Sumithran P, Proietto J. (2013). The defence of body weight: a physiological basis for weight regain after weight loss. Clin Sci. 124:231-241.
- Sundbom M, Hedberg J, Marsk R, Boman L, Bylund A, Hedenbro J, Laurenius A, Lundegårdh G, Möller P, Olbers T, Ottosson J, Näslund I, Näslund E; Scandinavian Obesity Surgery Registry Study Group. (2016). Substantial Decrease in Comorbidity 5 Years After Gastric Bypass: A Population-based Study From the Scandinavian Obesity Surgery Registry. Ann Surg. 15. [Epub ahead of print]
- Suzuki T and Hara H. (2010). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. Nutr Met 7,19.
- Suzuki Y, Kaneko R, Nomura M, Naito H, Kitamori K, Nakajima T, Ogawa T, Hattori H, Seno H, Ishii A. (2013). Simple and rapid quantitation of 21 bile acids in rat serum and liver by UPLC-MS-MS: effect of high fat diet on glycine conjugates of rat bile acids. Nagoya J Med Sci. 75:57-71.
- Svedberg J, Bjorntorp P, Smith U, Lonnroth P. (1990). Free-fatty acid inhibition of insulinbinding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. Diabetes. 39:570-4.
- Taupin, D. and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. Nat Rev Mol Cell Biol 4 : 721-732. Review.
- Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, Peluzio Mdo C. (2012). Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. Clin Nutr. 31:735-40. doi: 10.1016/j.clnu.2012.02.009.
- Temel RE, Sawyer JK, Yu L, Lord C, Degirolamo C, McDaniel A, Marshall S, Wang N, Shah R, Rudel LL, Brown JM. (2010). Biliary sterol secretion is not required for macrophagereverse cholesterol transport. Cell Metab 12:96-102.
- Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Davies JP, Nilsson LM, Yu L. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. J Clin Invest. 117:1968-78.
- Teo K, Lear S, Islam S, Dehghan M, Rosengren A, Lopez-Jaramillo P, Diaz R, Oliveira G, Miskan M, Rangarajan S, Iqbal R, Ilow R, Puone T, Bahonar A, Gulec S, Darwish EA, Lanas F, Vijaykumar K, Rahman O, Chifamba J, Hou Y, Li N, Yusuf S (2013). Prevalence of a healthy lifestyle among individuals with cardiovascular disease in high-, middle- and low-income countries: The Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study. JAMA: the journal of the American Medical Association. 309:1613-1621.

- Thomas C, Auwerx J, Schoonjans K. (2008). Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5-connecting nutrition and metabolism. Thyroid. 18:167-74. doi: 10.1089/thy.2007.0255. Review.
- Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Mataki C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. Cell Metab. 10:167-77. doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.001.
- Thomson A, Keelan M, Clandinin M and Walker K. (1986). Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. J Clin Invest 77, 279-288.
- Ties, J.S., Zlabek, J.A., Kallies, K.J., Al-Hamadini, M., and Kothari, S.N. (2014). The Effect of Laparoscopic Gastric Bypass on Dyslipidemia in Severely Obese Patients: a 5-Year Follow-up Analysis. Obes. Surg. 24, 549–553.
- Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Fändriks L, le Roux CW, Nielsen J, Bäckhed F. (2015). Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. Cell Metab. 22:228-38. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.009.
- Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchampt A, Zitoun C, Thorens B, Magnan C, Mithieux G, Andreelli F. (2008) Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. Cell Metab.8:201-11.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 285-293.
- Tuomi K, Logomarsino JV. (2016). Bacterial Lipopolysaccharide, Lipopolysaccharide-Binding Protein, and Other Inflammatory Markers in Obesity and After Bariatric Surgery.Metab Syndr Relat Disord. 14:279-88. doi: 10.1089/met.2015.0170.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 21;444:1027-31.
- Vague J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease.Am J Clin Nutr. 4:20-34.
- Van der Flier, L.G. and Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. Annu Rev Physiol 71 : 241-260.

- Van der Veen, JN., van, Dijk, TH., Vrins, CL, van, Meer, H., Havinga, R., Bijsterveld, K., Tietge, UJ., Groen, AK., and Kuipers, F. (2009) Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. J Biol Chem, 284, 19211-19219.
- Van der Velde AE, Vrins CL, van den Oever K, Seemann I, Oude Elferink RP, van Eck M, Kuipers F, Groen AK. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 295:G203-G208. doi: 10.1152/ajpgi.90231.2008.
- Van der Velde, AE., Vrins, CL., van, den, Oever, K., Kunne, C., Oude, Elferink, RP., Kuipers, F., and Groen, AK. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. Gastroenterology, 133, 967-975.
- Vandevijvere S, Chow CC, Hall KD, Umali E, Swinburn BA. (2015). Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. Bull World Health Organ. 93:446-456.
- Vassileva G1, Hu W, Hoos L, Tetzloff G, Yang S, Liu L, Kang L, Davis HR, Hedrick JA, Lan H, Kowalski T, Gustafson EL. (2010). Gender-dependent effect of Gpbar1 genetic deletion on the metabolic profiles of diet-induced obese mice. J Endocrinol. 205:225-32. doi: 10.1677/JOE-10-0009.
- Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, Buurman WA, de Vos WM, Rensen SS. (2013). Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity.Obesity (Silver Spring). 21:E607-15. doi: 10.1002/oby.20466.
- Verhaeghe R, Zerrweck C, Hubert T, Tréchot B, Gmyr V, D'Herbomez M, Pigny P, Pattou F, Caiazzo R. (2014). Gastric bypass increases postprandial insulin and GLP-1 in nonobese minipigs. Eur Surg Res. 52:41-9. doi: 10.1159/000355678.
- Vest AR, Heneghan HM, Agarwal S, Schauer PR, Young JB. (2012). Bariatric surgery and cardiovascular outcomes: a systematic review. Heart. 2012 98:1763-77. doi: 10.1136/heartjnl-2012-301778. Review.
- Villareal DT, Chode S, Parimi N, Sinacore DR, Hilton T, Armamento-Villareal R, Napoli N, Qualls C, Shah K. (2011). Weight loss, exercise, or both and physical function in obese older adults.N Engl J Med. 31;364:1218-29. doi: 10.1056/NEJMoa1008234.

- Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, Hindy G, Hólm H, Ding EL, Johnson T, Schunkert H, Samani NJ, Clarke R, Hopewell JC, Thompson JF, Li M, Thorleifsson G, Newton-Cheh C, Musunuru K, Pirruccello JP, Saleheen D, Chen L, Stewart A, Schillert A, Thorsteinsdottir U, Thorgeirsson G, Anand S, Engert JC, Morgan T, Spertus J, Stoll M, Berger K, Martinelli N, Girelli D, McKeown PP, Patterson CC, Epstein SE, Devaney J, Burnett MS, Mooser V, Ripatti S, Surakka I, Nieminen MS, Sinisalo J, Lokki ML, Perola M, Havulinna A, de Faire U, Gigante B, Ingelsson E, Zeller T, Wild P, de Bakker PI, Klungel OH, Maitland-van der Zee AH, Peters BJ, de Boer A, Grobbee DE, Kamphuisen PW, Deneer VH, Elbers CC, Onland-Moret NC, Hofker MH, Wijmenga C, Verschuren WM, Boer JM, van der Schouw YT, Rasheed A, Frossard P, Demissie S, Willer C, Do R, Ordovas JM, Abecasis GR, Boehnke M, Mohlke KL, Daly MJ, Guiducci C, Burtt NP, Surti A, Gonzalez E, Purcell S, Gabriel S, Marrugat J, Peden J, Erdmann J, Diemert P, Willenborg C, König IR, Fischer M, Hengstenberg C, Ziegler A, Buysschaert I, Lambrechts D, Van de Werf F, Fox KA, El Mokhtari NE, Rubin D, Schrezenmeir J, Schreiber S, Schäfer A, Danesh J, Blankenberg S, Roberts R, McPherson R, Watkins H, Hall AS, Overvad K, Rimm E, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Cupples LA, Reilly MP, Melander O, Mannucci PM, Ardissino D, Siscovick D, Elosua R, Stefansson K, O'Donnell CJ, Salomaa V, Rader DJ, Peltonen L, Schwartz SM, Altshuler D, Kathiresan S (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. Lancet Lond. Engl. 380, 572–580.
- Voshol P, Schwarz M, Rigotti A, Krieger M, Groen A and Kuipers K. (2001). 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., 356 ; 2 : 317-325.
- Walker Wa, Cornell r, Davenport L and Isselbacher K. (1972). Macromolecular absorption. Mechanism of horseradish peroxidase uptake and transport in adult and neonatal rat intestine. J.Cell Bol. 54,195-205.
- Wang D, Tazuma S, Cohen D and Carey M. (2003). Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 3 : G494-502.
- Wang DQ. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. Annu Rev Physiol. 69:221-48. Review.

- Wasserberg N, Hamoui N, Petrone P, Crookes PF, Kaufman HS. (2008). Bowel habits after gastric bypass versus the duodenal switch operation. Obes Surg. 18:1563-6. doi: 10.1007/s11695-008-9658-9.
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. (2004). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c.J Clin Invest. 113:1408-18.
- Welch I, Cunningham K and Read N. (1988). Regulation of gastric emptyning by ileal nutrients in humans. Gastroenterolgy 94, 401-404.
- West AM, Anderson JD, Meyer CH, Epstein FH, Wang H, Hagspiel KD, Berr SS, Harthun NL, DiMaria JM, Hunter JR, Christopher JM, Chew JD, Winberry GB, Kramer CM. (2011). The effect of ezetimibe on peripheral arterial atherosclerosis depends upon statin use at baseline. Atherosclerosis. 218:156-62. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.005.
- Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. Lancet. 28;373:1083-96. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60318-4.
- Whiteman DC, Wilson LF. (2016). The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review.Cancer Epidemiol. 22. pii: S1877-7821(16)30084-4. doi: 10.1016/j.canep.2016.06.013. Review.
- Wiersma H, Nijstad N, Gautier T, Iqbal J, Kuipers F, Hussain MM, Tietge UJ. (2010). Scavenger receptor BI facilitates hepatic very low density lipoprotein production in mice. J Lipid Res. 51:544-53. doi: 10.1194/jlr.M000844.
- Wittgrove AC, Clark GW, Tremblay LJ. (1994). Laparoscopic Gastric Bypass, Roux-en-Y: Preliminary Report of Five Cases.Obes Surg. 1994 Nov;4(4):353-357.
- Wu Q, Zhang X, Zhong M, Han H, Liu S, Liu T, Wei M, Guo W, Xie H, Hu S, Zhang G. (2016). Effects of Bariatric Surgery on Serum Bile Acid Composition and Conjugation in a Diabetic Rat Model. Obes Surg. 2016 Feb 3. [Epub ahead of print]
- Xie P, Jia L, Ma Y, Ou J, Miao H, Wang N, Guo F, Yazdanyar A, Jiang XC, Yu L. (2013). Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 33:920-5. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301187.
- Xu Y, Li F, Zalzala M, Xu J, Gonzalez FJ, Adorini L, Lee YK, Yin L, Zhang Y. (2016). Farnesoid X receptor activation increases reverse cholesterol transport by modulating

bile acid composition and cholesterol absorption in mice. Hepatology. 30. doi: 10.1002/hep.28712. [Epub ahead of print]

- Yin DP, Gao Q, Ma LL, Yan W, Williams PE, McGuinness OP, Wasserman DH, Abumrad NN. (2011). Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. Ann Surg.254:73-82. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182197035.
- Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. J Clin Invest. 110:671-80.
- Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:16237-42.
- Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, Prat A. (2008). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. Hepatology 48:646-54. doi: 10.1002/hep.22354.
- Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice.Proc Natl Acad Sci U S A. 24;103:1006-11.
- Zhou X, Yu J, Li L, Gloy VL, Nordmann A, Tiboni M, Li Y, Sun X. (2016). Effects of Bariatric Surgery on Mortality, Cardiovascular Events, and Cancer Outcomes in Obese Patients: Systematic Review and Meta-analysis. Obes Surg. 18. [Epub ahead of print]
- Zvintzou E, Skroubis G, Chroni A, Petropoulou P, Gkolfinopoulou C, Sakellaropoulos G, Gantz D, Mihou I, Kalfarentzos F, Kypreos KE. (2014). Effects of bariatric surgery on HDL structure and functionality: results from a prospective trial. J Clin Lipidol. 8:408-17. doi: 10.1016/j.jacl.2014.05.001.

Publications

- Blanchard C, Moreau F, Cariou B, Le May C. (2014). Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE): a new route for cholesterol excretion. Med Sci 30:896-901. doi: 10.1051/medsci/20143010017. Review. French.
- Ayer A, Borel F, Moreau F, Prieur X, Neunlist M, Cariou B, **Blanchard C***, Le May C*. Techniques of Sleeve Gastrectomy and modified Roux En-Y Gastric Bypass in mice. Accepted in JOVE.

Communications orales

-en 2015 :

Congrès « Nouvelle Société d'Athérosclérose » Biarritz 2015 : Effets des chirurgies bariatriques sur le métabolisme du cholestérol chez la souris. **Claire Blanchard** (Communication orale)

-en 2016 :

Congrès "Société Française d'Endocrinologie" Lyon 2016 : Effets de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol, chez la souris C57bl6. **Claire Blanchard**, François Moreau, Audrey Ayer, Cédric Le May, Bertrand Cariou

Congrès « Obesity Week » New Orleans 2016 : Impact of sleeve gastrectomy on intestinal permeability in diet-induced obese mice. **Claire Blanchard**, François Moreau, Audrey Ayer, Julien Chevalier, Jean-Paul Pais de Barros, Thomas Gautier, Bertrand Cariou, Michel Neunlist & Cédric Le May.

Communications affichées

- **En 2014 :**
  Congrès « Société Française et Francophone Chirurgie Obésité » Versailles 2014 : Caractérisation de l'effet hypocholesterolémiant de 2 types de chirurgie bariatrique chez la souris C57bl6 nourrie avec un régime hyperlipidique. **Claire Blanchard**, François Moreau, Cédric Le May, Bertrand Cariou.
- **En 2015 :**
  Congrès "Société Française de Diabétologie" Paris 2015 : Effets de sleeve gastrectomie sur le métabolisme du cholestérol, chez la souris C57bl6. Claire Blanchard, François Moreau, Audrey Ayer, Cédric Le May, Bertrand Cariou (Poster affiché)
- **En 2016 :**
  Congrès « Société Française et Francophone Chirurgie Obésité » Nice 2016 : Effets de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol, chez la souris C57bl6. **Claire Blanchard**, François Moreau, Audrey Ayer, Cédric Le May, Bertrand Cariou

Prix

- Prix meilleur Poster Soffco (**Société Française et Francophone Chirurgie Obésité)** 2014

- Bourse de la Fondation d'Entreprises Santedig 2014 : 7.500 euros pour le financement de la thèse de sciences

Partenariat/Collaboration :

- Michel Neunlist (U913) sur « Effets de sleeve gastrectomie sur les fonctions digestives »
- Partenariats sur les conséquences des chirurgies bariatriques sur les bourgeons du goût avec Philippe Besnard (Equipe Nutox Dijon)

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Prénom NOM Claire Blanchard-Louis

Titre de thèse **Effets de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme du cholestérol**

Title of thesis *Effect of bariatric surgery on cholesterol metabolism*

1/ Résumé

L'obésité représente un problème de santé publique majeur, avec une prévalence en augmentation. Celle-ci peut s'accompagner de complications métaboliques telles que le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, et les dyslipidémies. La chirurgie bariatrique constitue l'alternative thérapeutique de choix chez les patients obèses. La cholestérolémie est clairement améliorée chez les patients opérés, mais différemment en fonction des techniques chirurgicales pratiquées suggèrant que les mécanismes cellulaires et moléculaires impliquées varient selon les méthodes chirurgicales. Notre travail réalisé chez un modèle murin, a mis en évidence une baisse de la chlolestérolémie après roux en y gastric bypass (RYGB) plus importante qu'après une sleeve gastrectomie. Le RYGB induit une augmentation de l'excrétion fécale du cholestérol via une stimulation de l'excrétion transintestinale du cholestérol (TICE) et une réduction de la capacité intestinale à absorber le cholestérol. Dans ce contexte, et en élargissant dans la prise en charge de l'hypercholestérolémie, le TICE semble être une cible thérapeutique intéressante. Parallèlement à ce travail, nous avons étudié en collaboration avec l'INSERM U913 (Dr Neunlist), l'effet précoce de la sleeve gastrectomie sur la barrière intestinale. La sleeve induit des modifications de la perméabilité et de l'expression des protéines des jonctions serrées. Ces changements accroissent la translocation du LPS dans le plasma, favorisant ainsi un état pro-inflammatoire adipocytaire. L'effet tardif de la sleeve sur la perméabilité intestinale reste à être déterminé.

Mots clés

Obésité, Cholestérolémie, Chirurgie bariatrique, TICE, Absorption intestinale de cholestérol, perméabilité para et trans cellulaire

2/ Abstract

Obesity is a major public health issue, with increasing prevalence. Metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension and dyslipidemia are frequently associated with morbid obesity. Bariatric surgery represents the therapeutic alternative of choice for these patients. Clinical studies show thatplasma cholesterol is clearly improved after surgery. Interestingly, the magnitude of reduction depends on the surgical techniques used suggesting that cellular and molecular mechanisms involved are different.

Using mouse models,we demonstrated that Roux en Y Gastric Bypass (RYGB) strongly lowers plasma cholesterol compared to sleeve gastrectomy. RYGB increases fecal cholesterol excretion via the stimulation of trans intestinal cholesterol excretion (TICE) and a reduction of intestinal cholesterol absorption. In this context, and expanding in the management of hypercholesterolemia, TICE seems to be an interesting therapeutic target.In parallel with this work, we assessed, in collaboration with members of INSERM unit 913 (Dr Neunlist), the short-term effect of sleeve gastrectomy on intestinal barrier. We show that sleeve gastrectomy induces significant modifications of intestinal para and transcellular permeability by altering the expression of proteins involved in tight junctions. These changes favor plasma LPS translocation promoting a low grade pro-inflammatory state in adipose tissue. These effects of sleeve gastrectomy on intestinal permeability remain to be assessed after a longer post-surgical period.

Key Words

Obesity, Cholesterolemia, Bariatric surgery, TICE, Intestinal cholesterol absorption, Para and transcellular permeability