

Université de Montréal

**Le rôle des apoB-lipoprotéines sur la clairance des gras
dans le tissu adipeux blanc sous-cutané humain**

par

Simon Bissonnette

Département de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales

Octobre, 2012

© Simon Bissonnette, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Le rôle des apoB-lipoprotéines dans la clairance des gras dans le tissu adipeux blanc sous-
cutané humain

Présenté par :
Simon Bissonnette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Stéphanie Fulton, président-rapporteur
Dr May Faraj, directrice de recherche
Dr Gaétan Mayer, membre du jury

Résumé

OBJECTIF: La mauvaise clairance des lipoprotéines riches en triglycérides par le tissu adipeux blanc (TAB) entraîne l'hypertriglycéridémie, la résistance à l'insuline et la sécrétion hépatique d'apolipoprotéine B (apoB). Ce mémoire tente de déterminer si le LDL entraîne une clairance réduite des lipoprotéines riches en triglycérides par le TAB.

MÉTHODES/RÉSULTATS: Suivant l'ingestion d'un repas riche en gras marqué à la trioléine-¹³C, des femmes obèses postménopausées avec apoB plasmatique élevé (> médiane 0.93 g/L, N=22, 98% sous forme de IDL/LDL) avaient une clairance réduite de triglycérides-¹³C et acides gras non-estérifiés-¹³C (AGNE), comparées à celles avec un apoB plus bas. L'aire sous la courbe à 6 heures des triglycérides-¹³C et AGNE-¹³C plasmatiques corrélait avec l'apoB, suggérant une moindre captation dans les tissus périphériques chez les femmes avec apoB élevé. *Ex vivo*, suivant une incubation de 4 heures de biopsies de TAB avec de la trioléine-³H, l'apoB des patientes corrélait négativement avec les lipides-³H intracellulaires. Le traitement des biopsies de TAB des participantes avec leur propre LDL menait à une réduction de l'hydrolyse et de la captation de la trioléine-³H et à l'accumulation d'AGNE-³H dans le médium. *In vitro*, le LDL inhibait l'activité de la LPL. De plus, les adipocytes 3T3-L1 différenciés en présence de LDL avaient une hydrolyse et une captation réduite des lipoprotéines riches en trioléine-³H.

CONCLUSION: Ce mémoire suggère que le LDL diminue la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides par le TAB humain, ce qui pourrait expliquer la résistance à l'insuline observée chez des sujets avec apoB élevé.

Mots-clés : Tissu adipeux, diète et lipides diététiques, dyslipidémies, résistance à l'insuline, hyperapoB, diamètre du LDL, apoB48 et apoB100, clairance des lipides diététiques, FPLC

Abstract

OBJECTIVE: Delayed plasma clearance of postprandial triglyceride-rich lipoproteins (TRL) by white adipose tissue (WAT) promotes hypertriglyceridemia, insulin resistance and hepatic secretion of apoB-lipoproteins. The aim of this memoir was to examine whether low-density lipoproteins (LDL) induced delayed clearance of TRL by WAT.

METHOD/RESULTS: Six hours following the ingestion of a high-fat meal, 22 postmenopausal obese women were separated based on plasma apoB levels (above/below median of 0.93 g/L). The high apoB group had delayed plasma clearance of postprandial triglyceride and non-esterified fatty acids (NEFA) compared to women with low apoB. There was no group difference in triolein oxidation rate, suggesting a lower NEFA uptake and storage in peripheral tissue in women with high apoB. *Ex vivo*, following a 4 hour incubation of participant's WAT with synthetic ³H-triolein-TRL, plasma apoB correlated negatively with incorporated ³H-lipids. Incubation of women's WAT with their own LDL (90% of apoB-lipoproteins in plasma) decreased ³H-TRL hydrolysis and increased medium ³H-NEFA accumulation. *In vitro*, LDL directly inhibited LPL activity. Finally, LDL-differentiated 3T3-L1 adipocytes had lower ³H-TRL hydrolysis and ³H-NEFA storage.

CONCLUSION: This thesis suggests that LDL delay clearance and storage of TRL in human WAT, possibly explaining the increased insulin resistance observed in subjects with high apoB.

Keywords: Adipose tissue, diet and dietary lipids, dyslipidemias, insulin resistance, hyperapoB, LDL diameter, apoB48 and apoB100, dietary triglyceride clearance, FPLC

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abbréviations.....	viii
Remerciements.....	x
Avant-propos.....	xi
Chapitre I. Introduction.....	1
I.1. Vue d'ensemble.....	1
I.2. Justification.....	2
I.3. Objectif et hypothèses.....	2
Chapitre II. État des connaissances.....	3
II.1. Lipoprotéines.....	3
II.1.1. Structure et composition.....	3
II.1.2. Lipoprotéines athérogéniques : apoB-lipoprotéines.....	8
II.1.3. Lipoprotéines ne contenant pas l'apoB : HDL.....	12
II.2. Tissu adipeux.....	13
II.2.1. Genèse du tissu adipeux blanc.....	13
II.2.2. Fonctions du tissu adipeux blanc.....	15
II.2.3. Métabolisme des lipoprotéines au tissu adipeux blanc.....	16
II.2.4. Tissu adipeux blanc sous-cutané dysfonctionnel.....	21
Chapitre III. Problématique : comprendre et prévenir la dysfonction du tissu adipeux ...	24
Chapitre IV. Méthodologie et population d'étude.....	25
IV.1. Population étudiée.....	25
IV.2. Protocole d'étude des sujets.....	25

IV.3. Fournitures de culture cellulaire et biopsies.....	26
IV.4. Isolation du LDL.....	27
IV.5. Culture des adipocytes 3T3-L1	28
IV.6. Mesure de l'activité totale <i>in situ</i> de la LPL	28
IV.6.1. Préparation du substrat de triglycérides radioactifs	28
IV.6.2. Préparation du substrat d'acides gras radioactifs	29
IV.6.3. Effet du LDL sur la lipoprotéine lipase.....	29
IV.6.4. Effet du LDL sur les adipocytes 3T3-L1	30
IV.6.5. Prélèvement et préparation de la biopsie de tissu adipeux.....	30
IV.6.6. Effet du LDL sur les biopsies de tissu adipeux.....	31
IV.6.7. Extraction des lipides et mesure.....	31
IV.6.8. Mesure des lipides- ³ H intracellulaires	32
IV.7. Analyse statistique	32
Chapitre V. Article.....	33
V.1. Présentation.....	33
V.2. Abstract	34
V.3. Introduction.....	35
V.4. Methods.....	36
V.5. Results.....	42
V.6. Discussion	46
V.7. Acknowledgements.....	49
V.8. Reference List	50
V.9. Figure legends	60
Chapitre VI. Autres publications.....	67
Chapitre VII. Discussion et conclusion.....	68
VII.1. Discussion.....	68
VII.2. Conclusion.....	74
Bibliographie.....	76
Annexe I : Formulaire de consentement.....	i

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines Page 4

Tableau II : Classification des hyperlipidémies primaires selon Fredrickson Page 11

Liste des figures

Figure 1 : Métabolisme des apoB-lipoprotéines Page 8

Figure 2 : Effets du mauvais captage des acides gras par le tissu adipeux blanc Page 69

À ma famille

mère, père, sœur et frère,

et à mes amis,

*pour leurs encouragements à chaque
moment.*

À mon amour,

pour tout.

Liste des abbréviations

AG : Acide gras

AGNE : Acide gras non-estérifié

AHA : *American Heart Association*

ALP : phosphatase alcaline

ALT : alanine amino transférase

ApoA : Apolipoprotéine A

ApoB : Apolipoprotéine B

ApoC : Apolipoprotéine C

ApoE : Apolipoprotéine E

ATP : Adénosine tri-phosphate

AST : aspartate amino transférase

CETP : *Cholesteryl ester transfert protein*

CRPhs : *C-reactive protein* hautement sensible

EDTA : Éthylènediaminetétraacétate (agent chélateur)

FCHL : Hyperlipidémie familiale combinée

GGT : gamma glytanyl transpeptidase

HDL : Lipoprotéine de haute densité

IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire

LCAT : *Lecithin-cholesterol acyltransferase*

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LDLR : Récepteur au LDL

LRP : *LDL-receptor-related protein*

LPL : Lipoprotéine lipase

NEFA : *Non-esterified fatty acids* (acides gras non-estérifiés)

NHANES : *National Health and Nutrition Examination Survey*

PCSK9 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

RER : *Respiratory exchange ratio* (ratio d'échange respiratoire)

TAB : Tissu adipeux blanc

TG : Triglycéride

TRL : *Triglyceride-rich lipoproteins* (lipoprotéines riches en triglycérides)

TSH : *Thyroid synthesis hormone* (hormone de synthèse de la thyroïde)

UCP1 : *Uncoupling protein 1*

VLDL : Lipoprotéine de très basse densité

WAT : *White adipose tissue* (tissu adipeux blanc)

Remerciements

Je remercie d'abord **Dre Faraj**, pour son accueil chaleureux, son support inconditionnel et son habile orchestration de toutes les étapes de ce projet.

Je remercie aussi le **Dr Rabasa-Lhoret et son équipe**, pour leur collaboration et leur aide dans la réalisation de ce projet.

J'aimerais remercier **Annie Tardif**, qui a été un support technique et organisationnel indispensable dans ce projet. Son soutien moral a été fortement apprécié.

Je remercie **Maître Huda Salem**, qui a été responsable de la bonne marche des expériences *in vivo* et de toute l'analyse des isotopes de C¹³.

Je remercie chaudement **Nathalie Saint-Pierre**, collègue étudiante à la maîtrise sous la direction de Dre Faraj et infirmière, qui a été impliquée dans tous les tests cliniques et a été un support moral et technique constant tout au long de ce projet.

Je remercie **Maître Hanny Wassef** pour son expertise technique et son support moral.

Finalement, je remercie **Dr Dufour, Dr Baass et Dr Laroche**, qui ont donné temps et efforts pour le recrutement des participantes, leur évaluation médicale et l'extraction des biopsies de tissu adipeux.

Avant-propos

Le présent mémoire porte sur les mécanismes reliant des niveaux élevés d'apoB, une protéine plasmatique impliquée dans le transport du cholestérol, avec la dysfonction du tissu adipeux blanc chez l'humain.

Les chapitre I à IV présentent les connaissances et les procédés logiques reliés au travail réalisé.

Le chapitre V contient le fruit majeur de ma formation à la maîtrise en sciences biomédicales à l'Université de Montréal sous la direction de Dre May Faraj. C'est un article soumis à la revue *Journal of Lipid Research* traitant de l'effet des apoB-lipoprotéines sur la clairance des acides gras par le tissu adipeux.

Le chapitre VI présente une publication dans un article publié dans la revue *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Research*, dont certaines données proviennent d'expériences effectuées dans le cadre de ma maîtrise, ce qui m'a valu une place en tant que 3^e auteur.

Le chapitre VII discute des résultats obtenus dans le cadre de cette recherche et conclue ce projet. Le chapitre VIII fournit ensuite des perspectives de recherches futures.

Chapitre I. Introduction

I.1. Vue d'ensemble

L'obésité représente un problème croissant dans la population. C'est un facteur de risque de maladies cardiométaboliques et cardiovasculaires, incluant la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (1). Le surpoids est défini comme un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 25 kg/m² et l'obésité comme un IMC supérieur à 30 kg/m² (2). Toutefois, seule une fraction des personnes obèses sont vraiment à risque élevé (1). Il est donc important pour les cliniciens de considérer d'autres paramètres, dont les lipides, dans l'évaluation de ce risque. L'hypertriglycémie (triglycérides > 1,5 g/L ou 1,7 mM) est un facteur qui, lorsqu'associé à un tour de taille élevé (> 102 cm, hommes ; > 88 cm, femmes), augmente drastiquement le risque cardiométabolique (3). La prévalence de ce facteur de risque est particulièrement élevée, alors que 31% de la population américaine est hypertriglycémique. Les résultats du National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) indiquent que, des cinq composantes du syndrome métabolique, les triglycérides (TG) à jeun démontrent la meilleure association avec le risque cardiométabolique (4). L'obésité et les TG sont donc deux paramètres cliniques importants dans la prévention du risque.

Les TG sont entreposés dans le tissu adipeux blanc (TAB). Entre les repas, celui-ci réintroduit les TG dans la circulation sous forme d'acides gras non-estérifiés (AGNE), mais toujours en conservant les concentrations plasmatiques sous des niveaux toxiques. Le stockage retardé des TG alimentaires dans le TAB, concomitant à une relâche importante d'AGNE dans la circulation, mène à une déposition de lipides dans le foie, les muscles et le pancréas, des tissus qui développent ainsi des anomalies métaboliques. Le foie, ayant une capacité de stockage limitée, renvoie les TG dans la circulation en les assemblant sous la forme de lipoprotéines de très basse densité (VLDL), contribuant à une élévation du niveau de TG et d'apoB plasmatiques deux facteurs de risque cardiométabolique. L'apoB se retrouve à 95% sous forme de lipoprotéines de basse densité (LDL). C'est pourquoi une mauvaise fonction du TAB est associée à une augmentation du risque.

I.2. Justification

Les LDL sont connus pour leur implication dans la formation de la plaque athérogénique. Notre laboratoire a récemment démontré que des niveaux élevés d'apoB sont des prédicteurs de la résistance à l'insuline chez des femmes postménopausées obèses (5, 6). De plus, le LDL oxydé réduit la différenciation d'une souche d'adipocytes murins 3T3-L1 (7). Nous affirmons donc que des concentrations élevées d'apoB-lipoprotéines, particulièrement le LDL, pourraient mener à une diminution de la clairance plasmatique des TG postprandiaux en inhibant la fonction du TAB. À long terme, le flux d'acides gras dirigé vers les tissus autres que le tissu adipeux entraîne des anomalies métaboliques.

I.3. Objectif et hypothèses

L'objectif principal de ce mémoire est de déterminer la relation entre la clairance des triglycérides par le tissu adipeux blanc et les taux circulants de lipoprotéines contenant l'apoB100. Ceci sera évalué par l'utilisation de trois modèles, *in vivo* chez des femmes obèses, *ex vivo* dans des biopsies de TAB et *in vitro* dans une souche d'adipocytes d'origine murine et avec de la lipoprotéine lipase purifiée. Mon hypothèse est que le LDL va directement réduire la fonction du TAB, en réduisant l'hydrolyse de lipoprotéines synthétiques riches en triglycérides et le captage des AGNE relâchés.

Chapitre II. État des connaissances

II.1.Lipoprotéines

II.1.1.Structure et composition

Les lipoprotéines sont des protéines permettant le transport des lipides non-polaires, tels les TG et le cholestérol, dans le plasma sanguin. Les TG sont formés lorsque 3 molécules d'acides gras sont complexées à une molécule de glycérol, alors que les esters de cholestérol sont formés lorsqu'une molécule d'acide gras est complexée à une molécule de cholestérol (8). Sous forme de lipoprotéine, les TG et les esters de cholestérol insolubles en milieu aqueux sont ainsi solubilisés grâce à une couche de phospholipides (AG complexés à un acide phosphatidique et une base azotée), de cholestérol libre et de protéines amphipatiques. Les AG peuvent aussi se retrouver sous la forme non-estérifiée (AGNE), où ils sont soit liés à l'albumine pour leur transport dans le plasma ou solubilisés partiellement en milieu aqueux grâce à leur groupe acide carboxylique terminal (< 0.008% des AGNE totaux) (9). Toutefois, les AG peuvent circuler à des concentrations beaucoup plus élevées sous forme de TG ; 0,1 à 0,8 mM vs 0,4 à 1,5 mM, pour les concentrations d'AG vs TG à jeun, respectivement (10).

Historiquement, les lipoprotéines ont été identifiées d'abord selon leurs propriétés physico-chimiques, particulièrement la mobilité électrophorétique et la densité. Bien que les lipoprotéines forment un continuum de densité, taille et composition en lipides et apoprotéines, la présence de pics sur les profils obtenus par *fast protein liquid chromatography*, gel d'électrophorèse et ultracentrifugation par gradient de densité indique la présence d'accumulations, ce qui a permis de définir des catégories de lipoprotéines (voir Tableau 1).

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines

Lipoprotéines	Densité (g/dL)	Poids moléculaire (x 10 ⁶ Da)	Diamètre (nm)	Contenu en lipides (%)		
				TG	Chol	PL
Chylomicrons	0,95	400	75-1200	80-95	2-7	3-9
VLDL	0,095-1,006	10-80	30-80	55-80	5-15	10-20
IDL	1,006-1,019	5-10	25-35	20-50	20-40	15-25
LDL	1,019-1,063	2,3	18-25	5-15	40-50	20-25
HDL	1,063-1,21	0,17-0,36	5-12	5-10	15-25	20-30

TG : triglycérides; Chol : cholestérol; PL : phospholipides; VLDL : lipoprotéine de très basse densité; IDL; lipoprotéine de densité intermédiaire; LDL : lipoprotéine de basse densité; HDL : lipoprotéine de haute densité

Source : Ginsberg (11)

II.1.1.1. Contenu en lipides

Les TG sont transportés dans le plasma dans les chylomicrons et les VLDL. Les TG alimentaires sont hydrolysés par les lipases du tube digestif dans la lumière du duodénum, absorbés par les entérocytes puis sécrétés dans la circulation dans les chylomicrons. Les TG endogènes sont synthétisés dans le foie lors de la lipogenèse *de novo* et sécrétés dans la circulation sous forme de VLDL. Tous ces TG en circulation sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique, permettant la captation des acides gras résultants par les tissus (12). Une portion des TG est aussi progressivement échangée pour

des esters de cholestérol dans le LDL et le HDL par l'action de la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) (11, 13).

Le cholestérol est un constituant majeur du noyau des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), LDL et lipoprotéines de haute densité (HDL). C'est un précurseur d'hormones et il permet l'intégrité structurale de la membrane cellulaire. Tous les tissus ont la machinerie métabolique nécessaire à la synthèse du cholestérol, dont la 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA réductase ciblée lors du traitement par les statines (14). Le cholestérol ne peut être dégradé pour la production d'énergie ; son catabolisme principal est lors de sa sécrétion sous forme d'acide biliaire par le foie. Il se retrouve en faible quantité sur la surface des lipoprotéines, sous forme de cholestérol libre, mais surtout dans le noyau suite à son estérification par la *lecitin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) (11, 15).

Les phospholipides, représentés majoritairement par la lécithine dans la circulation, sont une classe de lipides amphiphatiques centraux à la solubilisation des lipoprotéines dans le plasma. Le groupe phosphate polaire permet une excellente solubilité en milieu aqueux et la chaîne non-polaire est dirigée vers l'intérieur de la lipoprotéine (11, 16).

II.1.1.2. Apolipoprotéines

L'apolipoprotéine quantitativement majeure présente dans le plasma est l'apolipoprotéine B100 (apoB100). Elle est majoritairement hydrophobique et a un poids moléculaire de 540 kDa. Elle compose 30% du poids protéique des VLDL, 60% des résidus de VLDL, aussi appelés IDL, et 90% des LDL. Elle est d'ailleurs une protéine structurale centrale et nécessaire dans l'assemblage de ces lipoprotéines et est impliquée dans leur catabolisme (17). Un domaine de liaison au récepteur à LDL (LDLR) se trouve dans la région 3100 à 3600 des acides aminés, permettant le captage par les tissus périphériques (11, 17).

L'apolipoprotéine B48 (apoB48) est la protéine structurale des chylomicrons. Chez l'humain, elle est synthétisée par les entérocytes à partir du même gène que l'apoB100 par *apoB mRNA editing complex-1* (apobec-1), qui édite la base cytidine-6666 en uridine,

insérant ainsi un codon stop. En résultat, l'apoB48 a donc 48% du poids de l'apoB100, d'où son nom. Chez les rats et les souris, apobec-1 est produit dans les entérocytes et les hépatocytes, menant à une production d'apoB48 par l'intestin et le foie. L'apoB48 n'a pas de site de liaison au LDLR (17).

L'apolipoprotéine C-I, retrouvée sur toutes les lipoprotéines sauf le LDL, inhibe la liaison de l'apoB au LDLR et au LDL receptor-related protein (LRP), diminuant ainsi le catabolisme de ces protéines. L'apolipoprotéine C-II est un activateur nécessaire à la fonction de la LPL (11, 18). Son absence est associée à l'hypertriglycéridémie sévère. On retrouve l'apoC-II sur les chylomicrons dans l'état postprandial et sur les VLDL et le HDL à jeun. L'apolipoprotéine C-III, retrouvée surtout sur les VLDL, mais aussi sur les chylomicrons, les IDL, et le HDL, est à l'inverse un inhibiteur de l'activité de la LPL et de la lipase hépatique. L'apolipoprotéine E se retrouve sur toutes les lipoprotéines sauf le LDL et est un ligand de plusieurs récepteurs, dont le LDLR et le LRP. Les 3 différents isoformes de l'apoE sont des facteurs génétiques associés à des niveaux circulants de VLDL et de LDL. Ces isoformes diffèrent dans leur interaction avec les récepteurs de surface cellulaire et leur impact sur le catabolisme des apoB-lipoprotéines. L'allèle E2 code pour un isoforme ayant une affinité réduite au LDLR et au LRP, ce qui mène à une réduction de la clairance des chylomicrons et VLDL et des TG postprandiaux élevés, alors que les niveaux de cholestérol et d'apoB sont réduits. La plupart des patients atteints d'hyperlipoprotéïnémie de type 3 sont homozygotes E2. L'allèle E3 est le plus courant dans la population. L'allèle E4 est associé au risque cardiovasculaire le plus élevé, avec des niveaux de LDL-C et d'apoB élevés (19). L'apoA-I, retrouvée sur le HDL, est synthétisée par le foie et l'intestin grêle. Elle est rapidement transférée sur le HDL immature. L'apoA-I est un activateur de la LCAT et permet le captage du HDL par le foie via sa liaison au *scavenger receptor* B1. L'apoA-II et l'apoA-IV sont aussi impliquées dans la régulation du catabolisme du HDL (11, 20).

II.1.1.3. Enzymes plasmatiques reliées au métabolisme des lipides

La lipoprotéine lipase (LPL) est l'enzyme principale permettant l'hydrolyse des TG en AGNE. Comme elle est entre autres synthétisée par les adipocytes, son mécanisme est couvert plus bas. La lipase hépatique (HL) est une enzyme sécrétée exclusivement par les hépatocytes. Elle a une forte homologie à la LPL et permet l'hydrolyse des TG et phospholipides contenus sur toutes les lipoprotéines. Elle est impliquée dans le mécanisme de conversion des VLDL en LDL. La CETP est une enzyme favorisant les échanges entre les TG des lipoprotéines riches en TG et les esters de cholestérol des lipoprotéines riches en cholestérol, ce qui mène à une augmentation des niveaux de LDL-cholestérol et à une augmentation des niveaux de TG sur les HDL. En présence d'hypertriglycéridémie dû à l'abondance de VLDL riches en TG, l'activité de la CETP effectue des échanges menant à des LDL enrichis en TG et réduits en esters de cholestérol. L'hydrolyse subséquente des TG par la HL participe alors à la formation accrue de LDL petits et denses (21, 22). La LCAT effectue l'estérification du cholestérol libre en surface des HDL, permettant donc l'accumulation de cholestérol estérifié dans le noyau de ces particules.

II.1.2. Lipoprotéines athérogéniques : apoB-lipoprotéines

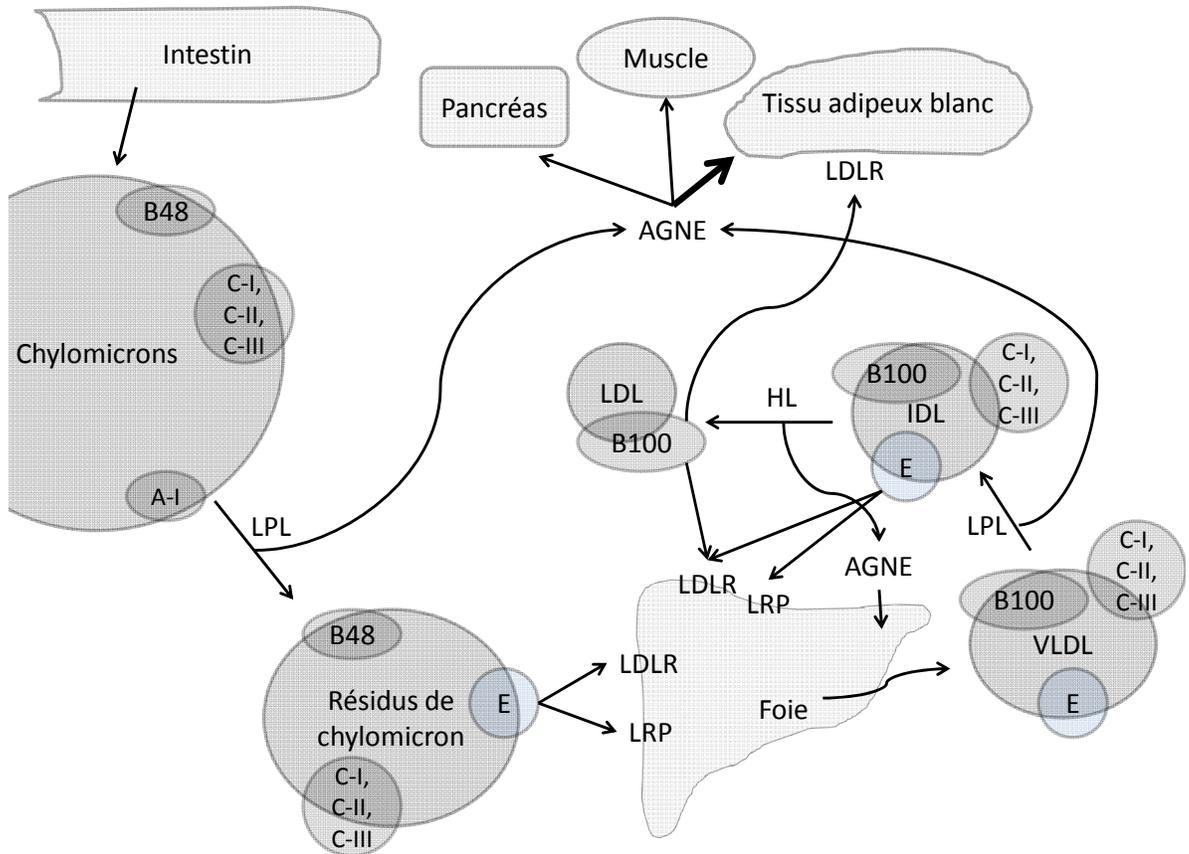


Figure 1 : Métabolisme des apoB-lipoprotéines

Légende : Flèche en gras, voie priorisée

Abbréviations : apolipoprotéines A-I, B48, B100 C-I, C-II, C-III et E ; lipoprotéine lipase, LPL ; lipase hépatique, HL ; récepteur de la lipoprotéine de basse densité, LDLR ; *LDLR-related protein*, LRP ; lipoprotéine de très basse densité, VLDL ; lipoprotéine de densité intermédiaire, IDL ; lipoprotéine de basse densité, LDL. Source : (23)

II.1.2.1. ApoB-lipoprotéines riches en triglycérides : chylomicrons et VLDL

La première catégorie d'apoB-lipoprotéines est responsable du transport des TG d'origine diététiques. Les TG alimentaires sont émulsifiés dans le duodénum par les sels biliaires, ce qui permet leur hydrolyse par les lipases pancréatiques. Les AGNE et le glycérol résultants sont absorbés par les entérocytes, qui les estérifient à nouveau. Ils y sont assemblés en chylomicrons, des lipoprotéines riches en TG contenant l'apoB48. Les chylomicrons circulent dans la lymphe, où ils y acquièrent l'apoC-II, l'apoC-III et l'apoE puis se retrouvent en circulation plasmatique via le canal thoracique. Moi et mon équipe avons récemment démontré que le TAB pourrait être une source d'apoC-I présent sur les lipoprotéines riches en TG, surtout les chylomicrons (24). Les tissus périphériques, dont les muscles, le foie et surtout le tissu adipeux, hydrolysent le contenu en TG des chylomicrons sous l'action de la LPL (tous les tissus) et de la HL (foie seulement). Des niveaux élevés d'apoB48 à jeun sont associés à l'athérosclérose, car ils indiquent une mauvaise clairance des TG postprandiaux et un captage déficient des chylomicrons (25). Suite à leur hydrolyse, les résidus de chylomicrons, enrichis en apoE et en esters de cholestérol, sont captés par le foie via le LDLR et le LRP, la lipase hépatique et certains protéoglycans de la surface cellulaire (26-28).

Les VLDL sont un produit hépatique permettant le transport des TG du foie vers les tissus périphériques. La production hépatique d'apoB100 est continue, mais la sécrétion de VLDL est TG et AGNE-dépendante; en absence de ces substrats, l'apoB100 est dégradée et recyclée (29, 30). Le contenu en TG du VLDL circulant est hydrolysé par la LPL. Ceci diminue le volume et augmente la densité du VLDL jusqu'à ce qu'il soit une lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL) (12). Les IDL peuvent être directement convertis en LDL ou peuvent être recaptés par les hépatocytes via le LDLR et le LRP engendrant leur clairance ou leur resécrétion sous forme de VLDL (11).

Le catabolisme des chylomicrons s'effectue selon les mêmes étapes que celui des VLDL, soit l'ancrage à la *glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1* (GPIHBP1), l'hydrolyse par la LPL activée par l'apoCII (31, 32) puis la captation des

résidus par le foie. Ces deux apoB-lipoprotéines riches en TG sont donc en compétition pour leur dégradation via la LPL dans l'état postprandial (33).

II.1.2.2. ApoB-lipoprotéines riches en cholestérol : LDL

À l'opposé des VLDL, les LDL sont fortement enrichis en cholestérol et contiennent peu de TG. Le LDL effectue le transport du cholestérol du foie vers les organes périphériques. Le catabolisme du LDL, soit sa captation, s'effectue de 70 à 80% via la voie du LDLR, le reste s'effectuant par endocytose sans interaction au LDLR ou via des voies alternatives de récepteurs (11, 34). Les niveaux circulants de LDL-cholestérol sont inférieurs à 3,36 mM chez un individu sain. Les niveaux totaux de cholestérol, qui se retrouvent majoritairement sur le LDL et le HDL, sont plutôt entre 3,88 et 5,15 mM (35).

Les LDL petits et denses ont été identifiés comme étant un facteur de risque additionnel des maladies cardiovasculaires. Ils sont associés à l'hyperlipidémie familiale (FH, type IIa de la classification de Fredrickson, LDL élevés) (36) et l'hypercholestérolémie familiale combinée (FCHL, type IIb de la classification de Fredrickson, LDL et VLDL élevés) (21). Les sous-types de LDL diffèrent par leur affinité de liaison au récepteur (37), leur susceptibilité à l'oxydation (38, 39) et de façon beaucoup plus caractérisée, leur potentiel athérogénique. Ceci pourrait être causé par les changements de diamètre de la particule, modifiant ainsi la conformation quaternaire de l'apoB100, ce qui mène à un changement de la charge de surface. Une accumulation de charges négatives en surface est associée à une affinité réduite au récepteur à LDL et donc une clairance diminuée du LDL (40).

La mesure de l'apoB plasmatique permet d'avoir une estimation du nombre de lipoprotéines athérogéniques en circulation, car chaque particule d'apoB-lipoprotéine ne contient qu'un seul apoB (41). En fait, la mesure d'apoB plasmatique reflète surtout le nombre de LDL circulants, puisque 90% de l'apoB se retrouve sur ces particules (42). Dans plusieurs études, l'apoB a été démontré comme étant un meilleur prédicteur des maladies cardiovasculaires que le LDL-C (43). L'utilisation de l'apoB au lieu du LDL-C comme

marqueur du risque cardiovasculaire est débattu; sa standardisation dans les laboratoires cliniques est assez récente et son coût de mesure est supérieur à celui du LDL-C. Le débat est très mécanistique : c'est le contenu en cholestérol du LDL qui s'accumule dans la plaque athérogénique, mais c'est l'apoB qui serait impliqué dans la captation de la particule de LDL par les macrophages et les cellules endothéliales. L'apoB est un meilleur prédicteur que le LDL-C pour le risque cardiovasculaire, surtout concernant le LDL-C sous traitement. C'est pourquoi l'*American College of Cardiology* et l'*American Diabetic Association* recommandent son utilisation pour le diagnostic et le suivi, particulièrement pour la quantification du risque cardiovasculaire résiduel après traitement (44).

Les désordres du métabolisme des lipoprotéines les plus courants ont été décrits par Fredrickson en 1965, à l'aide de la technique d'électrophorèse appliquée aux lipoprotéines plasmatiques. Ce premier guide a permis de classer les patients dyslipidémiques et de cibler ceux nécessitant des thérapies plus agressives. Il a aussi permis une approche plus systématique en lipidologie.

Tableau II : Classification des hyperlipidémies primaires selon Fredrickson

Type	Étiologie	Lipoprotéines élevées	Cholestérol	TG	Athérogénicité
I	LPL, apoC-II	Chylomicrons	Normal à +	++++	Aucune
IIa	LDLR (-/-), apoB	LDL	++	Normal	+++
IIb	LPL, apoB	LDL et VLDL	++	++	+++
III	apoE	IDL	++	+++	+++
IV	Inconnu	VLDL	Normal à +	++	+
V	LPL, apoC-II	VLDL et chylomicrons	Normal à +	++++	+

Légende : LPL, lipoprotéine lipase; LDLR, récepteur de la lipoprotéine de basse densité; LDL, lipoprotéine de basse densité, IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire; VLDL, lipoprotéine de très basse densité; TG, triglycérides. Sources : (23, 45)

Des résultats récents de notre équipe et d'autres supportent une implication de l'apoB dans les stades précoces de développement du diabète de type 2. D'abord, les niveaux d'apoB sont des prédicteurs de l'inflammation chronique chez les femmes postménopausées obèses (5). Aussi, une réduction des niveaux d'apoB par une diète hypocalorique dans cette même population corrèle avec une diminution de la résistance à l'insuline (6), alors que la diminution des niveaux circulants d'apoB corrèle avec une amélioration de la clairance des lipides alimentaires suite une chirurgie bariatrique (46). Finalement, une étude turque a rapporté que des niveaux élevés d'apoB plasmatique sont prédicteurs de l'incidence du diabète de type 2, indépendamment des marqueurs d'obésité centrale, d'inflammation et d'activité physique sur une période médiane de 5,9 ans (47). Cette observation a été corroborée dans une population autochtone canadienne. Cette fois, l'augmentation de l'apoB était le 2e meilleur prédicteur du diabète de type 2, surpassant l'augmentation du LDL-C ou la baisse du HDL-C, sans toutefois dépasser celle de l'augmentation des TG (48). Ensemble, ces données suggèrent que des apoB-lipoprotéines élevées pourraient promouvoir la mauvaise clairance des gras diététiques et la résistance à l'insuline.

II.1.3.Lipoprotéines ne contenant pas l'apoB : HDL

La troisième catégorie concerne plutôt le transport inverse du cholestérol, soit des tissus périphériques vers le foie. Le HDL est sécrété sous la forme d'un disque biconcave contenant l'apoA-I. C'est seulement suite à l'interaction avec les autres lipoprotéines et le cholestérol libre circulant qu'il s'enrichit en esters de cholestérol et prend une forme sphérique. Les niveaux à jeun d'apoA-I se situent entre 0,98 et 2,1 g/L pour les femmes et 0,88 et 1,8 g/L pour les hommes en santé. On souhaite typiquement des niveaux de HDL-cholestérol supérieurs à 1,04 mM, pour ses effets cardioprotecteurs (35). La diminution des niveaux de HDL-C survient lorsque le contenu en cholestérol est transféré vers les

lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL) par la CETP. Cette réaction est particulièrement favorisée en cas de niveaux élevés de TG plasmatiques, diminuant d'autant plus les niveaux de HDL-C (49). Un bas niveau de HDL-C est un facteur de risque résiduel sur le risque cardiovasculaire (50). Fait intéressant, il est possible d'obtenir des bas niveaux de HDL-C tout en ayant une protection cardiovasculaire, comme il est démontré chez les individus exprimant l'apoA-I Milano, une variante de l'apoA-I augmentant le catabolisme et donc le transport inverse du cholestérol (51).

II.2. Tissu adipeux

II.2.1. Genèse du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux est un organe composé de deux tissus dits brun et blanc. Le premier permet la thermogénèse sans frisson, alors que les gras stockés sont transformés en chaleur grâce à la *uncoupling protein 1* (UCP1) qui découple la chaîne de respiration mitochondriale de la production d'ATP. On peut détecter du tissu adipeux brun actif chez 4,5% de la population par la méthode du *positron emission tomography/computerized tomography* (PET/CT scan liée au ^{18}F -DG) (52). Le tissu adipeux blanc (TAB) permet plutôt de stocker l'énergie sous forme de graisse à haute densité calorique (9 kcal/g vs 4 kcal/g pour les glucides (53)). Aussi, moins d'eau est requise pour solubiliser ces gras ; la masse des adipocytes est constituée à 85% de gras. Au total, le tissu adipeux représente de 25 à 38% de la masse totale chez l'homme et 25 à 38% chez la femme, chez une population de 60 à 79 ans avec IMC entre 18,5 et 25 (54).

Contrairement à la plupart des organes, le TAB a plusieurs dépôts dans le corps humain. La fraction intra-abdominale (viscérale) est composée du TAB intrathoracique et intraabdominopelvique, lequel est subdivisé en intrapéritonéal (omental, mésentérique et ombilical) et extrapéritonéal (intraabdominal et intrapelvique). La fraction sous-cutanée, soit la plus efficace dans le métabolisme des gras, représente 80% du tissu adipeux total (55) et peut être troncale, abdominale, glutéofémorale et mammaire. Au niveau de l'abdomen, elle comporte une section profonde et une section superficielle, séparés par le

fascia de Scarpa (56, 57). Plus le TAB est profond, moins il est efficace pour l'entreposage des gras (57). Dans ce mémoire, le sujet d'étude est le TAB sous-cutané superficiel.

Le TAB est constitué d'adipocytes, mais aussi de la fraction stroma-vasculaire : cellules endothéliales, macrophages, cellules souches mésenchymateuses, *etc* (58). Les adipocytes composent 80 à 90% du volume du TAB, mais seulement 60 à 70% du nombre total de cellules (59). Pour se différencier en adipocytes, les cellules souches mésenchymateuses doivent exprimer une pléiade de facteurs de transcriptions. Alors que les signaux initiant la différenciation chez l'homme sont peu caractérisés, les études sur les adipocytes murins (particulièrement 3T3-L1) en utilisant un mélange stimulant la différenciation par hormones (insuline, dexaméthasone et isobutylméthylxanthine) ont permis une meilleure compréhension du processus de différenciation (58). La différenciation des adipocytes peut être séparée en deux étapes. La première, appelée détermination, survient lorsqu'une cellule souche mésenchymateuse pluripotente se dédie à la production d'adipocytes. Elle perd ainsi son statut pluripotent et devient un pré-adipocyte. La seconde étape, la différenciation terminale produisant l'adipocyte mature, implique un nombre de facteurs de transcription dans une séquence précise. D'abord, l'expression du *peroxisome proliferator activator receptor gamma* (PPARgamma) est nécessaire et suffisante pour la différenciation terminale chez les pré-adipocytes en culture (60). Son expression est toutefois régulée par une myriade de facteurs pro-adipogéniques, incluant *CCAAT-enhancer protein beta and delta*, *Krüppel-like factor 5*, *Krüppel-like factor 15*, *sterol regulatory element-binding protein 1c* et *CCAAT-enhancer protein alpha* (61). Dans ces derniers, une certaine chronologie existe. Par exemple, dans la famille *CCAAT-enhancer protein*, l'expression des membres *beta* et *delta* précède celles du *alpha* (62). L'activation de ces facteurs de transcription est fortement régulée. De fait, alors que l'adolescence corrèle avec une forte augmentation du nombre d'adipocytes matures, celui-ci demeure stable chez l'adulte (environ $5,5 \cdot 10^{10}$ adipocytes) (63).

Quelques études ont évalué l'espérance de vie moyenne des adipocytes. La méthode d'incorporation de l'eau deutérée dans l'ADN a permis d'évaluer que durant 9 semaines, le

taux de renouvellement des adipocytes leur prédisait une demi-vie de 240 à 425 jours (64). Une autre étude a démontré que le taux de renouvellement annuel des adipocytes est légèrement inférieur à 10% et la demie-vie est de 9 ans, selon des analyses effectuées sur l'intégration du ^{14}C dans l'ADN d'adipocytes isolés de tissu adipeux sous-cutané et de la cavité abdominale de sujets exposés aux bombes nucléaires de la Guerre Froide, entre 1955 et 1963 (63). La différence de demi-vie observée entre ces deux études provient probablement d'une différence expérimentale majeure ; la première évalue prospectivement l'espérance de vie d'adipocytes, donc particulièrement ceux nouvellement différenciés, alors que la deuxième évalue plutôt l'âge moyen d'adipocytes ayant déjà survécu un nombre important d'années. Dans les deux cas, ces études supportent que la qualité de la différenciation pourrait être un facteur important de la fonction du TAB pour plusieurs années.

II.2.2. Fonctions du tissu adipeux blanc

Le TAB est un organe retrouvé chez les mammifères. Il a des fonctions non-métaboliques de coussin mécanique protégeant les organes internes et d'isolation thermique. Le TAB est aussi un organe endocrine. Depuis la découverte en 1994 de la première adipokine (hormone sécrétée par le tissu adipeux), la leptine, la fonction de régulateur hormonal de l'homéostasie par le TAB est un champ de recherche en pleine croissance. S'est ensuivi la découverte de l'adiponectine, l'adipsine, *l'acylation stimulating protein*, l'angiotensinogène, l'*Agouti-related peptide* et la résistine, toutes des hormones aussi produites par le TAB (65). Celui-ci sécrète aussi une panoplie de cytokines telles le *Tumor necrosis factor alpha* (TNF-alpha), l'interleukine-6, le *plasminogen activating inhibitor-1* (PAI-1), le fibrinogène et les AGNE. Ces adipokines sont sécrétées dans des conditions particulières, indiquant au reste du corps l'état de stockage, d'inflammation et de stress du TAB. Ces adipokines modulent aussi la réponse du TAB à divers signaux métaboliques. Par exemple, l'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline alors que les cytokines proinflammatoires (IL-6, IL-1beta, TNF-alpha, etc) entraînent

l'insulinorésistance. Le TAB est donc un organe endocrine pouvant signaler l'état de ses réserves et ainsi participer à l'homéostasie corporelle.

Finalement, une des principales fonctions du TAB étudiée dans ce mémoire est la régulation de l'homéostasie des lipides (65). La capacité de stockage des adipocytes s'exprime morphologiquement par la formation de la gouttelette lipidique ; formée à ~ 95% de TG et contenant des PL et des protéines en surface. Cette organelle d'abord décrite par Altmann et Wilson en 1896 (66) n'a été étudiée intensivement que depuis la découverte de la *perilipin*, une protéine à sa surface (67). La gouttelette lipidique est enrobée de protéines, dont les PAT, pour *perilipin*, *adipophilin/adipocyte differentiation-related protein* (ADRP) et *tail-interacting protein of 47 kDa* (TIP47) qui ont pour rôle la coordination du stockage des lipides. La présence de cette organelle permet le stockage des lipides sous une forme stable, limitant le stress du réticulum endoplasmique généré par la lipotoxicité (66).

II.2.3.Métabolisme des lipoprotéines au tissu adipeux blanc

II.2.3.1. Métabolisme à jeun

Le corps humain est en continuel transfert entre l'état à jeun et l'état postprandial. Durant le jeûne, le corps priorise l'apport de nutriments vers les organes essentiels, soit le cerveau et le cœur. À cet effet, les tissus entrent dans un état catabolique et effectuent la glyco-génolyse, la gluconéogenèse et la lipolyse afin de produire et envoyer dans la circulation les deux nutriments endogènes de base : le glucose et les AGNE (65).

Durant le jeûne, le tissu adipeux approvisionne le corps en AGNE à partir de deux sources; 1) la lipolyse de ses stocks endogènes de TG et 2) l'hydrolyse du VLDL (68). La cascade enzymatique de la lipolyse s'effectue via l'activité des trois lipases, *desnutrin/adipose TG lipase* (ATGL), *hormone sensitive lipase* (HSL) et *monoacylglycérol lipase* (MGL), générant trois acides gras et un glycérol par molécule de TG (69). Les deux régulateurs majeurs de la lipolyse sont les cathécholamines et les glucocorticoïdes (70). La lipolyse est aussi stimulée par des fibres nerveuses sympathiques et des neurones sensitifs

innervant le TAB (71). L'étape limitante du relâchement des stocks de TG du TAB est l'hydrolyse par la HSL, dont l'activité est favorisée à jeun par l'action du glucagon et des catécholamines. Découverts plus récemment, les peptides natriurétiques, sécrétés par les cardiomyocytes durant l'exercice, la perte de poids et l'exposition au froid, entraînent une activation des *natriuretic peptide receptor* A et C (NPR-A et NPR-C), activant la cascade des protéines kinases cGMP-dépendantes menant à la lipolyse dans le TA et à l'activation de la thermogenèse dans le TA brun (72).

Le foie et divers tissus effectuent la captation des AGNE (73). La dégradation des AGNE produit de l'énergie utilisable par les cellules du corps. Les AGNE sont catabolisés dans les mitochondries lors de la bêta-oxydation, produisant de l'ATP et de l'acétyl-CoA, dont l'énergie peut à son tour être convertie en ATP via le cycle de l'acide citrique (74). Dans le foie, le flux d'AG sert plutôt à la néoglucogenèse, mais l'acétyl-CoA est transformé en corps cétoniques : acétylacétate, acide bêta-hydroxybutanoïque et acétone. Ces derniers circulent librement dans le sang vers d'autres tissus, particulièrement le cœur, pour y servir de substrat (75) et peuvent être une cause d'acidose chez les personnes soumises à un régime très strict en hydrates de carbone (76).

Le flux hépatique d'AGNE entraîne aussi la synthèse de TG et leur sécrétion sous la forme de VLDL. Les VLDL représentent la seconde source d'AGNE plasmatiques générés par le TAB et à un plus grand degré ceux générés par le muscle squelettique (77). Afin d'entrer dans les différents tissus, les TG contenus sur les VLDL doivent être hydrolysés par la LPL et les AGNE résultants captés localement (discuté plus bas).

Le métabolisme des apoB-lipoprotéines est central à toute étude des risques cardiovasculaires, étant entre autres relié au métabolisme des glucides (diabète) et à la dysfonction de la paroi artérielle (artériosclérose, AVC, infarctus, quelques maladies neurodégénératives, *etc*). Il est habituellement étudié dans un état à jeun, car les valeurs du métabolisme à jeun sont stables et reproductibles. Le métabolisme postprandial des lipoprotéines est actuellement peu utilisé pour les marqueurs cliniques, de par ses limitations au niveau de la faisabilité (repas standardisé, durée d'absorption des gras

variable) et de l'absence de critères diagnostiques. Toutefois, il représente une majorité du temps d'éveil, dû à la fréquence des repas (3 à 4 par jour) et la durée nécessaire à l'absorption des divers nutriments (jusqu'à 6 heures pour les gras).

II.2.3.2. Métabolisme postprandial

Suite à la prise d'un repas, l'abondance de nutriments mène le corps à un état anabolique, entre autres via la sécrétion d'insuline gluco-stimulée dans les cellules bêta du pancréas. La signalisation de cette hormone dans les tissus périphériques entraîne une panoplie d'adaptions métaboliques, inhibant les voies cataboliques (lipolyse par la HSL, glycogénolyse, protéolyse) et favorisant les voies anaboliques (lipogénèse, glycogénogénèse, synthèse des protéines). *In vivo*, afin de distinguer l'état catabolique ou anabolique du corps humain, la consommation d'O₂ et la production de CO₂ sont mesurées et un indice appelé le quotient respiratoire (QR) est calculé (c'est un ratio molaire de CO₂ et d'O₂). Cet index permet aussi d'évaluer la nature des substrats oxydés. Un QR de 0,67 est associé au catabolisme des cétones, alors qu'un QR de 0,7 est associé à l'oxydation des lipides, 0,8 des protéines, 0,84 au métabolisme mixte et 1,0 exclusivement des glucides. Un QR de 1.3 est plutôt associé à la lipogénèse ou à un état hyperventilatoire (78).

Un tissu adipeux fonctionnel est apte à répondre rapidement aux signaux postprandiaux pour capter les TG postprandiaux afin de rétablir l'homéostasie plasmatique. D'ailleurs, il a été rapporté que l'activité lipolytique du TAB sous-cutané est à peu près nulle à jeun, alors qu'elle atteint son pic d'activité (100%) une heure après un repas et diminue de 10 à 30% après 6 heures. (77). Afin d'effectuer la clairance des gras diététiques de la circulation par le TAB sous-cutané, trois étapes coordonnées doivent être complétées: l'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG par l'activité de la LPL, la captation des AGNE, et le stockage des AGNE.

II.2.3.2.1. Hydrolyse par la lipoprotéine lipase (LPL)

Comme indiqué précédemment, la clairance des lipoprotéines riches en TG débute par l'hydrolyse des TG circulants via la LPL. Les défauts génétiques sont associés à des cas

sévères d'hypertriglycéridémie (31, 79, 80). Cette enzyme est principalement produite par les cellules du parenchyme cardiaque, dans les muscles squelettiques et dans les tissus adipeux blancs et bruns. En plus des myocytes et des adipocytes, le gène est exprimé dans les hépatocytes, les glandes mammaires, le cerveau, les reins et les macrophages (81).

La LPL est sécrétée et effectue son activité une fois transportée sur la surface luminale des endothéliocytes vasculaires. Elle s'y lie aux *heparin sulfate proteoglycans* (HSPG) (82). C'est pourquoi il est possible de relâcher cette LPL par l'administration intraveineuse d'héparine, qui compétitionne alors avec la liaison du HSPG à la LPL. Des mutations sur les *glycophosphatidylinositol-linked proteins* (dont le GPIHBP1) sont associées à une réduction de l'activité de la LPL, particulièrement sur les chylomicrons (83, 84). Le mécanisme découvert récemment par Davies *et al* est que le GPIHBP1 lie et transporte la LPL de l'espace subendothélial vers le lumen du capillaire, là où elle hydrolyse les triglycérides en circulation sur les chylomicrons et VLDL (84, 85). Le domaine amino-terminal de la LPL contient le site actif (Ser132, Asp156 et His241) pour la lipolyse. Le domaine de liaison à l'héparine est plutôt en C-terminal. Les monomères natifs sont associés en homodimères actifs par liaison en tête-à-queue. Dans le plasma, la LPL est plus souvent sous forme monomérique inactive suite à sa dissociation du HSPG (86-88). Les coactivateurs connus de la LPL sont l'apoC-II, l'apoA-IV (89), apoA-V (90) et le *lipase maturation factor 1* (LMF1) (91). Des études sur la souche d'adipocytes murins 3T3-L1 ont permis de déterminer que la signalisation par l'insuline entraîne une augmentation de l'hydrolyse des TG via une synthèse et un recrutement augmentés de la LPL sur la membrane cellulaire (92). Les inhibiteurs connus de la LPL sont l'apoC-III, l'apoC-I ainsi que les *angiopoietin-like proteins* 3 et 4 (93). Nous avons récemment démontré que le TAB humain sécrète l'apoC-I, l'apoC-II et l'apoE. De plus, nous avons démontré que cette sécrétion d'apoC-I est associée à un enrichissement d'apoC-I sur les lipoprotéines riches en TG, réduisant ainsi leur clairance de la circulation (24). Ces résultats ont identifié un nouveau rôle du TAB dans le métabolisme des apoB-lipoprotéines. Les AGNE exercent une rétroinhibition sur l'activité de la LPL en inhibant sa sécrétion et son transport vers la surface endothéliale (94), en la déplaçant de son ligand membranaire, le HSPG (95) et en

interférant avec sa liaison à ses coactivateurs, notamment l'apoC-II (96, 97). Toutes ces régulations de l'activité de la LPL permettent de contrôler la quantité d'AGNE produits.

Les concentrations élevées d'AGNE, le produit de la LPL, sont toxiques pour l'organisme. 1) Elles engendrent une inhibition de la glycolyse dans le muscle squelettique (cycle de Randle). 2) L'accumulation des TG et les métabolites associés interfèrent avec la signalisation de l'insuline. Par exemple, elles activent des voies signalétiques (*c-Jun N-terminal kinase*, *nuclear factor-kappa B*, protéine kinase C) ayant comme substrat le récepteur à l'insuline et l'*insulin receptor substrate 1* (IRS1). 3) L'accumulation d'acyl-CoA induit un stress oxydatif. 4) Les acides gras activent les récepteurs nucléaires PPAR (98). C'est pourquoi des mécanismes efficaces empêchent que ces AGNE ne se retrouvent en grande concentration dans le sang à l'état postprandial, principalement par leur captage et leur stockage dans le TAB.

II.2.3.2.2. Captation des acides gras non-estérifiés

Les adipocytes du TAB étant enzymatiquement équipés pour le stockage des TG, ils peuvent accueillir un flux d'AGNE très important. Les AGNE sont captés par les adipocytes via plusieurs mécanismes dont l'importance relative est encore débattue. Trois mécanismes seront ici abordés.

Le premier mécanisme est le mouvement latéral sur le continuum interfacial des membranes cellulaires. Il a été proposé suite à l'observation par microscopie électronique de tissu adipeux brun de rat ayant reçu une injection de chylomicrons. Dans ce mécanisme, les acides gras hydrolysés sur les chylomicrons migrent le long d'une interface continue de phospholipides raccordant les membranes cellulaires des cellules endothéliales jusqu'à la gouttelette lipidique et la mitochondrie dans l'adipocyte. L'existence de ce mécanisme est supporté par l'existence en périphérie de la gouttelette lipidique d'un tourbillon lamellaire constitué de phospholipides et de produits de la lipolyse, tels les AGNE, s'y accumulant et formant cette structure caractéristique (99).

Le second mécanisme est le flip-flop, il implique une diffusion passive des AGNE au travers de la membrane cellulaire. Il explique principalement le transport des AGNE circulants liés ou non à l'albumine. Ce transport nécessite leur adsorption à la membrane, leur protonation et flip flop au travers de la membrane puis leur désorption de la membrane interne (100). Bien que rapide, ce mécanisme à lui seul n'explique pas la vitesse de diffusion observée *in vivo* (100, 101).

Le troisième mécanisme consiste en un transport facilité par protéines. Plusieurs protéines membranaires ont été identifiées dans le transport membranaire de par leur capacité de lier les AGNE avec forte affinité. La *plasma membrane fatty acid binding protein* (FABPpm) (102) et la *fatty acid translocase* (aussi appelée CD36) et la *fatty acid transport protein 1 et 4* (FATP1 et FATP4) (103) en sont de bons exemples (104). La production d'un gradient facilité pourrait favoriser le flip-flop des AGNE au travers de la membrane. Il a été démontré que la famille de FATP catalyse la réaction d'AGNE et d'acyl-CoA dans le cytosol, créant un gradient facilité d'AGNE au travers de la membrane (105, 106).

II.2.3.2.3. Stockage sous forme de triglycérides

Une fois captés par l'adipocyte, les AGNE sont stockés sous forme de TG par la voie du monoacylglycérol. Pour ce faire, ils sont d'abord «activés» par les acyl-CoA synthases en AGNE-CoA (107). Dans le réticulum endoplasmique en périphérie de la gouttelette lipidique, ils sont alors transformés en diacylglycérol puis triacylglycérol (TG) sous l'action de la monoacylglycérol acyltransférase puis des diacylglycérol acyltransférases 1 et 2, respectivement. Ils migrent alors dans le noyau de la gouttelette lipidique grâce à leur caractère non-polaire (108).

II.2.4. Tissu adipeux blanc sous-cutané dysfonctionnel

Les niveaux postprandiaux (2 à 4 heures) de TG plasmatiques permettent une meilleure prédiction du risque ajusté d'événements cardiovasculaires que les niveaux à jeun utilisés actuellement (109). Ainsi, l'incapacité du TAB à hydrolyser les lipoprotéines riches

en TG postprandiales et de capter les AGNE relâchés, référé dans ce mémoire en tant que dysfonction du TAB, serait un facteur intervenant plus tôt dans le développement du risque cardiométabolique (110).

Les résidus de chylomicrons et d'AGNE peuvent induire la lipotoxicité dans les tissus périphériques, notamment le foie, le pancréas et les muscles. Dans le foie, ceci augmente la production de VLDL, diminuant la clairance des chylomicrons par compétition sur la LPL, ce qui participe à augmenter l'hypertriglycéridémie postprandiale (111-114). Le flux d'acides gras vers le muscle peut mener à une dysfonction diminuant la sensibilité à l'insuline de ce tissu. Cet effet des AGNE a été démontré causal dans la pathogenèse du diabète de type 2 observé chez les sujets avec une résistance à l'insuline précoce dans les tissus périphériques. Dans le pancréas, le flux d'acides gras peut mener à une baisse de la capacité de cet organe à sécréter l'insuline. L'incubation de cellules pancréatiques *beta* avec des concentrations physiologiques élevées d'AGNE est associée à une baisse de la production d'insuline, et donc à une augmentation du risque d'insuffisance de la régulation glycémique menant au diabète de type 2.

La relation entre l'apoB-100 et la fonction du tissu adipeux blanc avait déjà fait l'objet d'un élégant travail par l'équipe de Skogsberg *et al*, qui avaient démontré chez des modèles de tissu adipeux sous-cutané humain, murin et chez les adipocytes 3T3-L1 que l'apoB entraîne une diminution de la lipolyse intracellulaire stimulée par noradrénaline (115). Sans toutefois s'intéresser à l'hydrolyse des TG en circulation, cette étude avait ainsi suggéré que le tissu adipeux blanc est sensible aux concentrations d'apoB. En effet, cette inhibition avait été abolie chez les souris *ldlr*^{-/-} humanisées *apob*^{100/100}, indiquant l'importance du LDLR dans ce signal métabolique.

Récemment, il a été démontré que l'ajout de LDL oxydé augmente la prolifération et diminue l'apoptose et la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 via son effet sur le récepteur CD36. En effet, Kuniyasu *et al* ont démontré que le LDL oxydé est endocyté par les adipocytes 3T3-L1 via le récepteur CD36 avant d'être dégradé dans l'endosome (116). *Cluster of differentiation 36* (CD36) est une glycoprotéine membranaire servant de ligand à

diverses lipoprotéines grâce à son domaine de liaison aux acides gras (117-119) et effectuant le transport des acides gras dans les myocytes et les adipocytes (120). Aussi, des préadipocytes 3T3-L1 traités avec du LDL oxydé ont une prolifération augmentée et une apoptose réduite. Les adipocytes 3T3-L1 différenciés en présence de LDL oxydé ont une expression soutenue de Pref-1, causant une expression plus timide d'Ap2 et de PPARgamma et un moindre stockage de lipides, le tout indiquant une inhibition de l'adipogenèse. À noter, l'ajout de LDL oxydé sur des adipocytes 3T3-L1 différenciés ramène l'expression de Pref-1 (7), suggérant une dé-différenciation. Les adipocytes 3T3-L1 exposés au LDL oxydé ont une voie de la protéine kinase C active, menant à la translocation nucléaire du *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2), induisant l'expression du gène codant CD36 (121). Le LDL oxydé est donc internalisé par les adipocytes et entraîne l'activation de voies signalétiques réduisant l'adipogenèse.

Chapitre III. Problématique : comprendre et prévenir la dysfonction du tissu adipeux

Les connaissances actuelles nous ont amené à croire que les niveaux élevés d'apoB-lipoprotéine pourraient être une cause et non seulement une conséquence du TAB dysfonctionnel. Notre étude vise donc à examiner la relation entre des niveaux élevés d'apoB-lipoprotéines et la mauvaise captation des acides gras par le tissu adipeux blanc chez une population de femmes en surpoids ou obèses.

La première hypothèse est que les niveaux d'apoB-lipoprotéines circulants sont associés à une mauvaise clairance postprandiale des acides gras chez des participantes soumises à repas riche en gras marqués au ^{13}C (*in vivo*). La seconde est que l'apoB-lipoprotéine majoritaire (90% des niveaux circulants d'apoB), le LDL, inhibe l'hydrolyse et la captation des lipoprotéines riches en TG par les biopsies de tissu adipeux sous-cutané (*ex vivo*). La troisième est que les adipocytes 3T3-L1 différenciés en présence de LDL ont une réduction de leur fonction d'hydrolyse et de captage des lipoprotéines riches en TG (*in vitro*).

Chapitre IV. Méthodologie et population d'étude

IV.1. Population étudiée

Les 22 sujets sont recrutés selon les critères d'inclusion suivants : 1) femme de 45 à 74 ans ; 2) IMC > 27 kg/m² ; 3) hormone folliculo-stimulante plasmatique > 30 U/L (ménopausée) et sans hormonothérapie de remplacement depuis ≥ 3 mois ; 4) poids stable : variation de poids ≤ 2 kg depuis 3 mois ; 5) sédentarité : activité physique faible (< 2 heures hebdomadaires d'activité physique structurée) ; 6) non-fumeuse ; 7) moins de 2 consommations d'alcool par jour ; 8) aucun antécédent de diabète, d'hypertension, de maladie cardiovasculaire (défini par un score de Framingham ≥ 20%) (122), gastro-intestinale, respiratoire, hormonale, ou tout autre condition médicale ou psychologique pouvant influencer les résultats, ou nécessiter une prise en charge médicale, à la discrétion de l'investigateur (May Faraj) et du médecin traitant (Dr Rémi Rabasa-Lhoret).

IV.2. Protocole d'étude des sujets

Les participantes, recrutées par annonces dans les journaux, sont dirigés vers la clinique de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (Montréal, Québec, Canada) dans le cadre de l'étude principale «Cibler l'hyperapoB pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses; mécanisme d'action». Les données de ce mémoire sur le métabolisme du gras ne concernent que les sujets qui ont aussi pris part à la sous-étude intitulée «Cibler l'hyperapoB pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses; mécanisme d'action – Sous Étude». Tous les sujets ont lu et signé les formulaires de consentement ci-joints. Ces documents ont été approuvés par le Comité d'éthique humaine de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal le 16 août 2010. Les sujets participent en premier lieu à un questionnaire téléphonique. Ensuite, lors de la première visite, elles sont informés en détails du contenu du formulaire de consentement et diverses mesures anthropométriques (poids, taille, tension artérielle) ainsi qu'une prise de sang à jeun (14 mL) sont prises. Sont alors mesurés à l'hôpital Hôtel-Dieu de Montréal : formule sanguine complète, HbA1c, glucose, urée, créatinine, sodium, potassium, acide urique,

protéines totales, albumine, TSH, ALT, AST, GGT, ALP, bilirubine totale et FSH. Les triglycérides, cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol (calculé) et l'apoB sont mesurés par analyseur automatique COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostic, Montréal, Canada) dans notre laboratoire à l'IRCM. Tous ces marqueurs permettent de déterminer l'éligibilité du sujet. Les participantes rencontrent la semaine suivante un médecin collaborateur de l'étude pour un examen médical et leur poids est mesuré. Le poids du sujet est alors mesuré hebdomadairement pour au moins 2 semaines afin d'assurer la constance du poids (variation < 2 kg par mois). À la 5^e visite, les participantes sont soumises à des mesures de composition corporelle (poids, tour de taille, tour de hanche, Dual-Energy X-Ray Absorptiometry) (5, 6), de métabolisme au repos durant 20 minutes par calorimétrie indirecte (V_{\max} encore, Cardinal Health) (6, 46, 123) et de clamp Botnia. Ce dernier consiste en un test de tolérance au glucose par voie intraveineuse d'une heure suivi d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique de 3 heures. Les tubes de sang (50 mL) servant à l'isolation du LDL des participantes à jeun sont prélevés au début de cette journée. Le glucose est mesuré par analyseur automatique (YSI 2300 STAT Plus, Life Sciences) et l'insuline par essai radioimmunologique humain (Millipore Corporation). À la visite suivante, elles participent à un test de tolérance au gras par voie orale, communément appelé *Fat Load* (46). Une biopsie à jeun du tissu adipeux sous-cutané de la hanche, de 200 à 500 mg, est prise par aspiration via aiguille par un médecin collaborateur sous anesthésie locale (Xylocaïne 20 g/L, Astrazenaca, Mississauga, ON) (124, 125).

IV.3. Fournitures de culture cellulaire et biopsies

La souche 3T3-L1 provient de l'American Tissue Culture Collection (ATCC CL-173). Les mixtures FBS et DMEM : F12 (1 :1) sont obtenues de Gibco BRL (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Les plaques 24-puits (polystyrène, fond plat) proviennent de Starstedt (Newton, NC, USA) et les plaques 48-puits (polystyrène, fond plat) de Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA). La trioléine marquée au tritium (³H), du trioléine-[9,10(N)-³H] (91,0 Ci/mmol) ainsi que l'oléate marquée au ³H, de l'oléate-[9,10(N)-³H] (45,5 Ci/mmol) sont obtenues de Perkin Elmer (Boston, MA). Sigma-Aldrich

Canada, Ldt est fournisseur d'insuline, dexaméthasone, 3-isobutyl-1-méthylxanthine, trioléine, oléate de sodium, L- α -phosphatidylcholine (100 g/L dilué dans le chloroforme) de jaune d'œuf et albumine de sérum bovin (BSA) isolée par choc thermique.

IV.4. Isolation du LDL

La technique d'ultracentrifugation par gradient de densité permet l'isolation du LDL. Le sang des participantes à jeun est centrifugé à 3000 rpm à 4°C pour 15 minutes et le plasma est récolté. Il est ensuite dilué dans 2 volumes d'une solution de NaCl :EDTA (densité 1,006 g/mL, 0,01% d'EDTA) et ultracentrifugé 2 heures (ultracentrifugeuse XL-90 Beckman, rotor Ti50, tubes 10 mL, 45 000 rpm, 5°C). Le 2 mL supérieur de surnageant (VLDL) est récolté par aiguille et jeté. Le culot est resuspendu et la densité de la solution apportée à 1,019 g/L par l'ajout d'une solution de KBr (densité 1,069 g/mL, 0,01 % d'EDTA) et ultracentrifugé 8 heures selon les paramètres ci-haut. Le 2 mL de surnageant (IDL) est alors aspiré et jeté. Le culot restant est resuspendu et la densité alors augmentée à 1,063 g/mL par une solution de KBr (densité 1,345 g/mL, 0,01 % d'EDTA) puis ultracentrifugé 32 heures. Le 2 mL supérieur de surnageant (LDL) est aspiré et conservé.

La solution de LDL est dessalée dans un tube de filtration par centrifugation Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (maximum 15 mL), ultracel 100 kDa) (3000 rpm, swinging bucket, Sorvall, 1h30, 4°C). Deux autres fois, le LDL conservé dans le filtre est resuspendu dans 12 mL de solution saline (0,15 M NaCl + 0,01% EDTA) et centrifugé. Le LDL concentré et dessalé est alors recueilli et stérilisé par filtration grâce à une seringue 1 mL U-100 et un filtre 0,2 μ m Supor Membrane, Low Protein Binding (PALL Life Sciences) vers un tube cryogénique 2 mL stérile. La concentration d'apoB est mesurée par analyseur automatisé COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostic, Montréal, Canada). La solution de LDL est conservée stérile à 4°C pour un maximum de 3 semaines avant utilisation.

IV.5. Culture des adipocytes 3T3-L1

Les préadipocytes murins 3T3-L1 sont incubés à 37°C avec du médium de culture DMEM : F12 (1 :1) additionné de 10% de FBS, 100 mg/L de streptomycine et 100 000 u/L de pénicilline et dans des flasques 75 cm² BD Falcon (Bedford, MA, USA). Les cellules sont passées avec une confluence maximum de 70%, au plus 5 fois depuis la réception de la souche cellulaire. L'ensemencement est effectué sur plaque 24-puits à 21 000 cellules par puit. Deux jours après la confluence, ici appelé Jour 0, la différenciation est favorisée par l'ajout de dexaméthasone (0,25 µM), d'3-isobutyl-1-méthylxanthine (0.5 µM) et d'insuline (1,74 µM) au milieu de croissance. Au jour 2, le milieu de culture est changé et seule l'insuline (1,74 µM) y est ajoutée. Ce milieu avec insuline est changé au jour 5. L'expérience sur les cellules différenciées est effectuée au jour 7 ou 8 (126).

IV.6. Mesure de l'activité totale *in situ* de la LPL

IV.6.1. Préparation du substrat de triglycérides radioactifs

Le substrat de triglycérides radioactifs permet d'évaluer la fonction d'hydrolyse et de captage des acides gras par les biopsies de TAB et les adipocytes 3T3-L1 selon une méthode décrite précédemment (126, 127). Le substrat, consistant en des micelles de triglycérides marqués radioactivement dans une solution aqueuse, est préparé en quatre étapes dans un tube conique de 15 mL en polypropylène. Premièrement, la phase lipidique de trioléine non-marquée (concentration finale de 640 nmol/puits après dilution 9 dans 10 avec la solution de NaCl: EDTA et/ou LDL), de phosphatidilcholine (54 µg/puits), de ³H-trioléine (3,15 uCi/puits) y est ajoutée dans du toluène (5 µL/puits) puis vortexé 10 secondes. Deuxièmement, le tout est évaporé 20 minutes sous jet faible de gaz inerte (azote). Troisièmement, la phase aqueuse de BSA 8.5% (w/v dans du DMEM:F12) (2,04 % w/v par puits), de tampon TRIS (2M, pH 7,2, 113 µL/puits), de sérum d'homme à jeun (34 µL/puits) et de SFM (DMEM/F12, 45 µL/puits) y est ajoutée et vortexée. Finalement, la sonication (75 Watts, 200 sec, 10 sec ON, 10 sec OFF sur glace en alternance) permet

l'assemblage des micelles. Des portions de 5 uL de ce substrat sont mesurées dans le compteur à scintillation pour en déterminer l'activité radioactive, soit une mesure du nombre de comptes par minute correspondant à cette concentration de $^3\text{H-TG}$. À ce substrat utilisé sur les biopsies de TAB, on ajoute 50 uL de solution de NaCl: EDTA (densité 1,006 g/mL, 0,01% d'EDTA) ou de LDL afin d'obtenir les conditions contrôle ou celles avec LDL à 1.2 g/L d'apoB.

IV.6.2. Préparation du substrat d'acides gras radioactifs

Pour le substrat d'acides gras non-estérifiés radioactifs, une phase lipidique d'oléates tritiés (0,5 $\mu\text{Ci/puits}$) est introduite dans un tube 15 mL puis évaporée sous jet d'azote. Ensuite, de l'oléate: BSA non marqué (5 mM : 0.833 mM dans du DMEM : F12, soit 5X la concentration finale) est chauffé à 67°C et ajouté à l'oléate radioactif. Le tout est immédiatement vortexé une minute afin de permettre l'incorporation des oléates marqués sur l'albumine. Du DMEM : F12 (350 uL/puit) est ajouté afin d'obtenir une concentration finale d'acides gras de 1 mM. Des échantillons de 5 μL sont conservés et leur activité radioactive comptée. Un volume de 450 uL de substrat sera dilué avec 50 uL de solution NaCl: EDTA (densité 1,006 g/mL, 0,01% d'EDTA) et/ou du LDL à 1,2 g/L d'apoB pour son utilisation sur les biopsies de tissu adipeux.

IV.6.3. Effet du LDL sur la lipoprotéine lipase

Le substrat de TG marqués radioactivement pour la LPL est différent de celui pour les adipocytes et biopsies mais préparé selon les mêmes étapes (126). La phase lipidique contient plutôt de la trioléine non-marquée (concentration finale de 141 nmol/puits), de phosphatidilcholine (6,0 $\mu\text{g/puits}$), de $^3\text{H-trioléine}$ (0,4 uCi/puits) dans du toluène (4,86 $\mu\text{L/puits}$). La phase aqueuse est constituée de BSA 8.5% (w/v dans du DMEM:F12) (2.23 % w/v par puits), de tampon TRIS (2M, pH 8.2, 25 $\mu\text{L/puits}$), de sérum d'homme à jeun (7.5 $\mu\text{L/puits}$) et d'eau ultrapure (37,5 $\mu\text{L/puits}$) auquel est ajouté 10 uL de solution NaCl : EDTA (densité 1,006 g/mL, 0,01% d'EDTA) ou de LDL à 1,2 g/L d'apoB (126). L'activité

de la LPL purifiée par Sigma ainsi que celle extraite à partir de cellules 3T3-L1 via héparine (100 ug/mL, 45 minutes, 37°C, plaques 6-puits) ont été mesurées.

IV.6.4. Effet du LDL sur les adipocytes 3T3-L1

Au substrat pur ci-haut est ajouté du LDL et sa solution de transport, le NaCl: EDTA (densité de 1.006 g/mL, 0.01% EDTA), afin d'obtenir une concentration d'apoB de 1.2 g/L et une concentration de TG de 141 nmoles pour un volume de 250 µL par puit. Les puits contrôles ne reçoivent qu'un substrat pur dilué dans le NaCl : EDTA pour obtenir les mêmes concentrations, mais sans LDL. Les adipocytes 3T3-L1 sont d'abord rincés avec 1 mL de *Hank's Buffered Saline Solution* (Life Technologies, Californie, USA) préchauffé à 37°C avant de recevoir ces substrats avec ou sans LDL. Après quatre heures d'incubation (37°C, 5% CO₂), le substrat est transféré dans un tube 1,5 mL puis les adipocytes sont doucement rincés deux fois avec du *phosphate buffered saline* (4°C) (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄-7 H₂O 2,68g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,4). Les lipides intracellulaires sont ensuite extraits grâce à l'ajout d'une solution d'heptane : isopropanol (3 :2) (v/v), d'abord 1 mL laissé jusqu'au lendemain scellé dans un parafilm et ensuite transféré dans un autre tube 1,5 mL, puis 0,5 mL laissé une heure et transféré dans ce même tube. Les tubes de médium et de lipides intracellulaires sont conservés à -20°C jusqu'à analyse (126). Une moyenne de 6 expériences avec LDL provenant de femmes différentes a été présentée.

IV.6.5. Prélèvement et préparation de la biopsie de tissu adipeux

La biopsie de tissu adipeux blanc sous-cutané est lavée avec du tampon HBSS à 37°C et transféré dans 30 mL de tampon HBSS (1X) supplémenté de streptomycine (100 ug/mL) et pénicilline (100 U/mL). La biopsie est ensuite séparée en pièces de 5 à 10 mg et transférée dans une plaque 48-puits qui contient du HBSS à 37°C jusqu'au début de l'incubation avec les substrats radioactifs. Chaque condition contient environ 3 à 6 échantillons.

IV.6.6. Effet du LDL sur les biopsies de tissu adipeux

Afin d'évaluer la fonction des biopsies, les pièces précédemment préparées sont transférées dans 500 uL de chaque substrat radioactif, avec et sans LDL, avec au moins chaque condition en triplicata, dans une plaque 48-puits. Le tout est incubé quatre heures à 37°C et 5% CO₂ sous légère agitation. Le milieu d'incubation est transféré dans des tubes 1,5 mL et les biopsies transférées dans une plaque 48-puits contenant du PBS à 4°C pour rinçage. Les biopsies sont ensuite transférées dans un autre tube 1,5 mL contenant 1 mL d'heptane : isopropanol (3 :2) (v/v) et laissées avec agitation douce jusqu'au lendemain. Ensuite, le solvant est transféré dans un tube 1,5 mL et une seconde portion de 0,5 mL d'heptane : isopropanol (3 :2) (v/v) est ajoutée dans le tube contenant la biopsie et laissée à agiter 30 minutes. Le solvant est de nouveau transféré dans le même tube, contenant maintenant 1,5 mL de lipides intracellulaires extraits dans le solvant. Les tubes de milieu et de lipides intracellulaires extraits sont conservés à -20°C jusqu'à analyse (126).

IV.6.7. Extraction des lipides et mesure

Les tubes de milieu sont décongelés et 200 uL de chaque est transféré vers un tube 2 mL, auquel est ensuite ajouté 5 volumes (soit 1 mL) de chloroforme : méthanol (2 :1 v/v). Les tubes sont vortexés et laissés 30 minutes à température pièce avant d'être centrifugés (1500 rpm, 15 minutes). La phase supérieure de méthanol et l'interphase de protéines sont aspirées et jetés à l'aide d'une pipette. La phase inférieure apolaire de chloroforme contenant les lipides-³H est ensuite évaporée jusqu'au lendemain. Cette phase est ensuite resuspendue dans 25 µL de CHCl₃ : MeOH (2 :1 v/v) puis vortexée. Dans le cas des substrats ne contenant que des acides gras marqués, 20 µL est directement transféré dans des tubes à scintillation. Pour les substrats de TG marqués, 20 µL est transféré sur une plaque de silice LK5 150 Å (Whatman, Clifton, NJ) pour effectuer la séparation des TG-³H et des AGNE-³H par la technique de chromatographie sur couche mince. Le tampon de migration (phase mobile) d'hexane : éther : acétate (75 :25 :1 v/v) permet la migration (AGNE R_f = 0,22 et TG R_f = 0,5) d'environ une heure. Après séchage (15 min), les TG-³H

et AGNE-³H sont révélés avec de la vapeur d'iode et identifiés grâce à des standards de TG et AGNE. L'iode est ensuite évaporé jusqu'au lendemain. Les bandes de silice contenant les TG-³H et AGNE-³H sont ensuite grattées et transférées dans des tubes à scintillation et identifiés. Tous les tubes à scintillation reçoivent ensuite 5 mL de fluide à scintillation Cytoscint (MP Biomedicals, Santa Ana CA, USA), vortexés, et laissés une heure sur Bellydancer avant d'être mesurés dans un compteur à rayonnement *beta* (126).

IV.6.8. Mesure des lipides-³H intracellulaires

Les tubes de lipides-³H intracellulaires sont décongelés et laissés à évaporer jusqu'au lendemain. Ils sont alors resuspendus dans 200 µL de CHCl₃ : MeOH (2 :1 v/v) et vortexés. Ils sont ensuite transférés en duplicata de 20 µL vers des tubes à scintillation auxquels sont ajoutés 5 L de fluide à scintillation. Les tubes sont alors vortexés et leur activité radioactive mesurée dans le compteur de rayonnement *beta* (126).

IV.7. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les données de cellules 3T3-L1 sont interprétées par analyse de variance (ANOVA) en comparant les groupes sans/avec LDL grâce au post-test de Bonferroni. La fonction des biopsies de tissu adipeux est comparée par test *t* de Student avec pairage. Les analyses sont produites grâce à GraphPad Prism (version 5.04). Chaque condition d'incubation est reproduite au moins en quadruplicata. La significativité est fixée à $P \leq 0.05$.

Chapitre V. Article

V.1.Présentation

Journal : Journal of Lipid Research

Révisions demandées en septembre 2012

Titre : Low density lipoproteins delay clearance of triglyceride-rich lipoproteins
by human subcutaneous adipose tissue

Auteurs : Simon Bissonnette^{1,2*}, Huda Salem^{1,2*}, Hanny Wassef^{2,3}, Nathalie Saint-Pierre^{1,2}, Annie Tardif², Alexis Baass^{2,3}, Robert Dufour^{1,2}, May Faraj^{1,2,4}

¹ Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec

² Institut de Recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec

³ Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec

⁴ Montreal Diabetes Research Center (MDRC), Montréal, Québec

* Contribution égale de ces auteurs à ce travail

Rôle dans l'étude

Avec mon équipe, j'ai participé au recrutement, à la vérification de l'éligibilité, au suivi nécessaire à l'évaluation des participants.

J'ai effectué et analysé toutes les expériences *in vitro* et *ex vivo*.

J'ai effectué, conjointement avec Huda Salem qui a conduit les études *in vivo*, l'analyse statistique et l'écriture du manuscrit.

J'ai participé à l'écriture et à la révision de l'article.

V.2. Abstract

Objective: Delayed plasma clearance of postprandial triglyceride-rich lipoproteins (TRL) by white adipose tissue (WAT) promotes hypertriglyceridemia and elevated plasma apoB-lipoproteins, primarily LDL. This study examines whether LDL induces delayed clearance of TRL by WAT.

Methods/Results: Following the ingestion of a ^{13}C -triolein-labelled high-fat meal, obese women with high plasma apoB (> median 0.93 g/L, N=11, > 98% as IDL/LDL) had delayed plasma clearance of postprandial ^{13}C -triglyceride and ^{13}C -NEFA over 6-hours compared to women with low apoB. The $\text{AUC}_{6\text{hrs}}$ of plasma ^{13}C -triglyceride and ^{13}C -NEFA correlated with plasma apoB but not with LDL diameter or adipocytes' area. There was no group-difference in ^{13}C -triolein oxidation rate. Altogether, this suggests lower ^{13}C -NEFA uptake and storage in peripheral tissue in women with high apoB. Ex vivo, following 4-hours-incubation of women's WAT with synthetic ^3H -triolein-TRL, plasma apoB correlated negatively with WAT ^3H -lipids. Treatment of women's WAT with their own LDL decreased ^3H -TRL hydrolysis and increased medium ^3H -NEFA accumulation. In vitro, LDL directly inhibited LPL activity. Finally, LDL-differentiated 3T3-L1 adipocytes had lower ^3H -TRL hydrolysis and ^3H -NEFA storage.

Conclusion: These findings suggest that LDL delay clearance and storage of TRL in human WAT, which may act in a positive feedback mechanism further promoting hepatic production of apoB-lipoproteins and hypertriglyceridemia.

Key words: Adipose tissue, diet and dietary lipids, dyslipidemias, insulin resistance, hyperapoB, LDL diameter, apoB48 and apoB100, dietary triglyceride clearance, FPLC

V.3.Introduction

White adipose tissue (WAT) is the most physiological depot with unlimited capacity to store triglyceride, thus it plays a major role in the regulation of lipid metabolism in the fasting and postprandial states (1-5). In the fasting state, WAT releases non-esterified FA (NEFA) into the circulation to be taken up and oxidized by peripheral tissues for energy. In the postprandial state, reciprocal changes occur in the WAT function, mainly driven by postprandial signals like insulin, which inhibits the lipolysis of endogenous WAT-TG stores and increases the clearance of triglyceride-rich lipoproteins (TRL) of intestinal (chylomicrons, apoB48-lipoproteins) and hepatic (VLDL, apoB100-lipoproteins) origins. The clearance of TRL by WAT requires three sequential steps: 1) the hydrolysis of TRL by endothelial lipoproteins lipase (LPL); 2) the uptake of LPL-generated NEFA by adipocytes; 3) and, finally, the trapping of NEFA and storage as TG (2, 4). Healthy WAT is thus able to switch promptly from fasting (NEFA release) to postprandial (NEFA trapping) re-establishing homeostasis in plasma TG and NEFA after the ingestion of a meal. The trapping of dietary LPL-generated NEFA in human subcutaneous WAT is almost absent in the fasting state, increases to 100% 1 hour after a meal and then decreases to 10-30% 6 hours following the ingestion of a meal (4).

Delayed plasma clearance of postprandial TRL by WAT is closely associated with hypertriglyceridemia, elevated concentrations of apoB-lipoproteins and insulin resistance in humans (5-9). This stems from the findings that decreased postprandial plasma clearance of chylomicron and trapping of NEFA by WAT promote their flux into non-adipose peripheral tissues, including muscle, pancreas and liver, inducing lipotoxicity and insulin resistance (5, 10, 11). In the liver, this also leads to increased synthesis and secretion of VLDL, which further reduce chylomicron clearance due to competitive binding to LPL (8, 12-16). Chronic delayed TRL clearance, hepatic overproduction of VLDL, delayed TRL-remnant removal and increased generation of LDL leads to hypertriglyceridemia and increased plasma apoB-lipoproteins, measured as plasma apoB (8, 17, 18). The role of WAT in lipoprotein metabolism is essential, that inherent abnormalities in WAT function are

believed to lead to the most common dyslipoproteinemia, Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL), characterized by hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, hyperapoB, small dense LDL and insulin resistance (9, 19).

The mechanisms responsible for delayed plasma clearance of postprandial TRL in WAT are not fully understood. However recently, the uptake of oxidized LDL by 3T3-L1 adipocytes was reported to increase cell proliferation and to decrease cell apoptosis and differentiation (20-22). This suggests that apoB-lipoproteins may directly reduce adipocyte function. In addition, multiple clinical studies have demonstrated that statin therapy, which reduces plasma concentrations of apoB-lipoproteins, improves plasma TG clearance (23-26). As most apoB-lipoproteins are in the form of LDL (18), these findings prompted us to hypothesize that LDL promotes hypertriglyceridemia by hindering WAT function and postprandial TRL clearance in humans.

To test this, we examined postprandial TRL clearance in healthy postmenopausal overweight and obese women using *in vivo*, *ex vivo* WAT and *in vitro* adipocytes models. Our hypotheses were that: 1) women with high plasma apoB have reduced plasma clearance of dietary TRL and NEFA, and 2) women's LDL directly inhibits the function of their own WAT measured as reduced hydrolysis of synthetic TRL and uptake of NEFA and 3) women's LDL directly reduce the function of 3T3-L1 adipocytes.

V.4. Methods

Study design and population: Twenty-two post-menopausal women were studied. The inclusion criteria were: BMI ≥ 27 kg/m², age = 45-74 years, non-smoker, sedentary (< 2 hours of structured physical exercise/ week), and low alcohol consumption (< 2 drinks/day). The exclusion criteria were: elevated risk of cardiovascular disease ($\geq 20\%$ calculated Framingham Risk Score) (27), prior history of chronic disease (untreated thyroid disease, cardiovascular disease, diabetes), inflammatory diseases or cancer within the last 3 years, claustrophobia, abnormal plasma values (Hb < 120 g/L, creatinine > 100 μ mol/L, AST or

ALT > 3 times normal limit), abnormal blood coagulation, concomitant medications: hormone replacement therapy (except thyroid hormone at a stable dose), lipid lowering, hypotensive agents, systemic corticosteroids, anti-psychotic medications - psychoactive medication, anticoagulant treatment, weight-loss agents or adrenergic agonist, known substance abuse, lack of time to participate in the full length of the study (5 weeks). The 22 women were separated into 2 groups based on median plasma apoB, which represents an average of 2 values measured twice, 3-weeks apart. All participants gave written informed consent prior to initiation of the study, which had been approved by the Ethics Board at IRCM.

Anthropometric and metabolic measurements: All analyses were conducted at the end of a 4-weeks weight stabilisation period (\pm 2 kg) in order to eliminate the effects of weight fluctuation on the measured metabolic outcomes (28). Body composition was measured by dual energy x-ray absorptiometry (General Electric Lunar Corporation version 6.10.019) (29, 30). Resting metabolic rate (RMR) and substrates oxidation rates were measured over 20 min by indirect calorimetry (V_{\max} encore, Cardinal Health) (30-32). Serum lipids and apoB were measured by automated analyser and LDL-C was calculated by the Friedewald equation (33) (COBAS INTEGRA 400, Roche Diagnostic), plasma apoB48 by ELISA (BioVendor USA/Canada) (34), serum glucose by an automated analyzer (YSI 2300 STAT Plus™, Life Sciences) and insulin by a human radioimmunoassay (Millipore Corporation)

Lipoproteins profiling and LDL isolation: LDL diameter was measured by an automated polyacrylamide gel electrophoresis system that separates apoB-lipoproteins based on size into 1 TRL, 3 IDL and 7 LDL fractions (FDA-approved, Lipoprint system, Quantimetrix (35)). Fresh plasma lipoproteins were also fractionated by size using fast protein liquid chromatography (FPLC, Sepharose 6 column) (36). As a quality control, we measured and compared the concentrations of cholesterol in the fasting TRL and IDL/LDL fractions as separated by the FPLC and by the Lipoprint. The cholesterol concentrations measured by these 2 techniques were highly correlated (TRL: $r = 0.82$, IDL/LDL: $r = 0.92$,

$p < 0.0001$), indicating the reliability of the FPLC-fractionation of the lipoproteins. ApoB and apoE concentrations in 80 FPLC fractions were quantified by in-house ELISA using polyclonal antibodies against human apolipoproteins (Academy Biomedical) as published (36). Women's LDL was isolated from fresh fasting plasma by sequential ultracentrifugation using KBr density solution (1.019 - 1.063 g/mL, 0.01% EDTA) and Beckman Ti-50 rotor (45,000 rpm, 32 hours, 5°C), after removal of TRL and IDL (density < 1.019 g/mL). LDL solutions were desalted 3x with 12 mL saline (0.01% EDTA), then sterile filtered (0.2 μ m filters) and stored at 4°C for later use in the ex vivo and in vitro experiments within 2-3 weeks of isolation. LDL was not contaminated with HDL since the concentration of apoA-I in isolated samples was under detectable limits (< 0.058 g/L by COBAS).

Postprandial in vivo fat clearance: The clearance and oxidation of a ^{13}C -labelled high-fat meal was assessed as previously published with modifications (32). At $T = -1$ hr, fasting subcutaneous WAT samples were obtained by the physicians of the study from the right hip by needle biopsy under local anaesthesia (Xylocaine 20 mg/ml, AstraZeneca) (37, 38). Fasting RMR, breath and blood samples were collected at $T = 0$ hr, followed by the consumption of a high-fat meal that was labeled with ^{13}C -triolein (glycerol tri(oleate-1- ^{13}C), 99 atom% ^{13}C , Sigma-Aldrich Canada) standardized to body surface area (600 kcal/m², 0.017 gm ^{13}C -triolein/g fat, 68% fat, 18% carbohydrate). Serial measurements of respiration and collection of breath and blood samples were conducted at 1, 2, 4, and 6 hours postprandially. Breath samples were obtained by blowing into sealed bags and transferred into 10 mL vacutainers. Plasma lipids were extracted with chloroform: methanol (2:1) and separated by TLC (32). The ^{13}C enrichment in the breath $^{13}\text{CO}_2$ and plasma ^{13}C -TG and ^{13}C -NEFA were analysed by isotopic ratio mass spectrophotometer with a continuous flow module (Vario Micro CHNS Cube, Elementar Americas Inc). The mass spectrometry was calibrated using 2 international L-glutamate standards (USGS40 and USGS41) purchased from International Atomic Energy Agency (<http://nucleus.iaea.org>) with ^{13}C -enrichment of -26.389 and +37.626 ppm. The samples' ^{13}C -enrichment was calculated as previously described (32) as:

$$\Delta^{13}\text{C} \text{‰}_{t=i} = [(R_{S t=i} - R_{VPDB}) / R_{VPDB}] \times 10^3$$

where $\Delta^{13}\text{C} \text{‰}_{t=i}$ = Delta at time = i hr in part per million (ppm), $R_{S t=i}$ = $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of the sample at time = i hr, R_{VPDB} = $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of the international standard $V_{PDB} = 0.0112372$.

The % of ^{13}C -recovered in breath $^{13}\text{CO}_2$ per hour was calculated as:

$$\%^{13}\text{C}_{\text{rec/hr}} = [(\text{mM excess } ^{13}\text{C}/\text{mM CO}_2_{t=i}) / \text{mM } ^{13}\text{C}_{\text{admin}}] \times \text{mM CO}_2_{\text{excreted/hr}} \times 1.3 \times 100$$

where $\text{mM excess } ^{13}\text{C}/\text{mM CO}_2_{t=i} = (\Delta^{13}\text{C} \text{‰}_{t=i} - \Delta^{13}\text{C} \text{‰}_{t=0}) \times R_{VPDB} \times 10^{-3}$

$$\text{mM } ^{13}\text{C}_{\text{admin}} = [\text{mg } ^{13}\text{C-triolein} / \text{M}] \times [(P \times n) / 100]$$

$$\text{mM CO}_2_{\text{excreted/h}} = \text{CO}_2_{\text{excreted}} (\text{mL/hr}) / 22.4$$

where $\text{mg } ^{13}\text{C-triolein}$ = weight of administered $^{13}\text{C-triolein}$, M = Molecular weight of $^{13}\text{C-triolein}$ or 885.4 g/mol, P = ^{13}C -isotope purity or 99%, n = number of labelled carbon position or 3, 1.3 = correction factor to adjust for the uptake of label into the HCO_3 pool with bolus feeding (32, 39-41), 22.4 is the volume in liters of 1 mole of CO_2 .

The concentrations of $^{13}\text{C-TG}$ and $^{13}\text{C-NEFA}$ in the plasma pools at each time point were calculated as follows (32, 39-41);

$$^{13}\text{C} \text{ atom percent (AP)} = R_{S t=i} / (R_{S t=i} + 1) \times 100$$

$$^{13}\text{C} \text{ atom percent excess (APE)} = \text{AP}_{t=i} - \text{AP}_{t=0}$$

$$\text{Plasma } ^{13}\text{C-NEFA}_{t=i} (\mu\text{M}) = \text{APE}_{S t=i} \times \text{plasma NEFA} (\mu\text{M})_{t=i}$$

$$\text{Plasma } ^{13}\text{C-TG}_{t=i} (\mu\text{M}) = \text{APE}_{S t=i} \times \text{plasma} (\mu\text{M})_{t=i}$$

where ^{13}C APE represents % increase in the ^{13}C -enrichment in plasma samples taken after the ingestion of the ^{13}C -labeled meal compared to fasting background ^{13}C -enrichment.

The effect of LDL on in situ LPL activity in women's WAT: The direct effect of LDL on women's WAT function ex vivo was assessed as in situ LPL activity in the presence or absence of each woman's own LDL. In situ LPL activity refers to the

hydrolysis of synthetic ^3H -triolein-labelled-TRL (^3H -TRL), and the uptake and storage of LPL-released ^3H -NEFA as previously described (42, 43). Fresh WAT samples (5-10 mg) were cleaned, blotted dry, weighed and collected in warm HBSS buffer for 30 min, then transferred to fresh 24-well plates containing 500 μL ^3H -TRL (95% TG, 1.27 mM TG, 0.54 M Tris-HCl, pH 7.2, in DMEM/F12, 5.1% BSA, and 7.5% fasting serum (42, 43)) and incubated on a shaking plate for 4 hours. The amount of ^3H -TRL hydrolyzed was calculated by subtracting medium ^3H -TG remaining after the 4-hours incubation from the added ^3H -TRL dose, both expressed per mg of WAT. The accumulation of ^3H -NEFA was measured as medium ^3H -NEFA remaining after the 4-hours incubation expressed per mg of WAT. Of note, we previously reported that addition of the LPL-inhibitor tetrahydrolipstatin, to the ^3H -TRL substrate reduces intracellular ^3H -lipids in 3T3-L1 adipocytes, indicating that the accumulation of intracellular ^3H -lipids is dependent on LPL activity (42). To assess if LDL effects are LPL-independent, a second set of fresh WAT samples were incubated with 500 μL ^3H -oleate-labelled-NEFA bound to BSA (1 mM oleate: 0.167 mM albumin in DMEM/F12) (43). The amount of ^3H -NEFA uptake was calculated by subtracting medium ^3H -NEFA remaining after the 4-hours incubation from the added ^3H -FA: albumin dose, both expressed per mg of WAT. WAT and medium ^3H -lipids were extracted and separated by TLC (42, 43). The average of 3 – 6 WAT samples/ condition is reported.

To examine the direct effect of LDL on LPL activity, the activity of purified LPL in a standard curve of 0 – 1 units was measured over 45 minutes using a similar ^3H -TRL substrate (1.41 mM TG) as that described above (42) in the presence or absence of LDL (0.6 and 1.2 g apoB/L). Moreover, 3T3-L1-adipocytes were differentiated for 7 days as previously published (42), and adipocytes'-associated LPL activity was assessed after adipocytes' incubation with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin (45 min) to detach LPL (42). Heparin wash was collected and measured for LPL activity (42) in the presence or absence of LDL (0.6 and 1.2 g apoB/L). The activity LPL naturally released into the medium over 45 minutes was also measured as background. A representative experiment of $N = 3$ is presented.

The chronic effect of LDL on 3T3-L1 adipocytes' function: 3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated for 7 days (42), in the presence or absence of women's LDL (1.4 g apoB/L) with medium change every 2 days. On the day of experiments, medium was removed and adipocytes were washed and incubated with the ^3H -TRL substrate (0.56 mM TG) for 4 hours and in situ LPL activity was measured as above (42). Cell viability was determined by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release in the medium using a commercial kit (CytoTox 96 assay, Promega) (42). The average of N=6 experiments from different LDL women-donors is presented.

Adipocyte Area: WAT samples obtained by the needle-biopsy were immediately fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and cut into 4 μm slices. Adipocyte area was measured in a blinded fashion by digital-imaging analysis. The average surface areas of 1111 ± 96 adipocytes in 6 fields of view, in 3 WAT slides are reported per woman. The 3 slides were at least 48 μm apart to avoid multilayered images of one cell. The adipocyte area represents the area of the pixels within intact cell membranes measured using Matlab software (MathWorks) at the microscopy core at IRCM. Images were obtained using Leica DMRB microscope (Leica, Montreal, QC) and a Retiga EXi camera (Q-Imaging, Burnaby, BC) on a 0.67X mount over a 10X/NA 0.3 phase contrast objective.

Statistical Analysis: Data are presented as mean \pm SEM. Group differences over the 6-hrs time curves were analyzed by RM 2-way ANOVA with interaction. When interaction was significant, intra-subject differences were analyzed by paired t-test, while inter-subject differences were analyzed by unpaired t-test. Non-parametric Wilcoxon-rank sum test was used when equal variance, measured by Mauchly's sphericity test failed (plasma ^{13}C -TG and ^{13}C -NEFA data). Spearman correlation was used to examine the association between variables. Statistical analysis was performed using SPSS V13 and significance was set at $p \leq 0.05$.

V.5. Results

Twenty-two healthy postmenopausal overweight and obese women were separated based on plasma apoB median (0.93 g/L) into 2 groups of low and high apoB. The women with high plasma apoB had higher fasting plasma TC, LDL-C, TG, and apoB48 and smaller LDL diameter (Table 1). There were no group differences in any of the other parameters examined.

Postprandial plasma clearance of TRL and NEFA: As presented in Figure 1, there were no significant group-differences in postprandial plasma glucose or insulin (Fig 1A and 1B). However, women with high apoB had delayed postprandial plasma clearance of total TG over the 6 hours (2-way RM-ANOVA, Fig 1C), and had higher increment increase in area under the curve over 6 hours of plasma TG above baseline (iAUC_{6hrs}) (high vs low: 8.46 ± 1.43 vs 4.00 ± 0.69 mM, $p= 0.011$), a difference that remained significant after model adjustment for fasting plasma TG (high vs low: 6.82 ± 0.80 vs 5.64 ± 0.80 mM, $p < 0.001$). On the other hand, the 2 groups had identical concentrations of plasma NEFA over 6 hours with similar postprandial drop at 1 and 2 hours, which suggests equivalent insulin-induced inhibition of lipolysis in WAT (Fig 1D).

Moreover, women with high apoB had delayed postprandial plasma clearance of dietary TG, as evident by higher plasma ¹³C-TG at 6-hours (high vs low: 44.8 ± 17.4 uM vs 7.81 ± 3.33 , $p= 0.039$, Fig 2A) and greater AUC_{6hrs} of plasma ¹³C-TG (high vs low apoB: 8872 ± 3267 vs 3089 ± 1186 uM, $p= 0.045$). The fate of LPL-released ³H-NEFA was also significantly different between the 2 groups. In women with low apoB, plasma ¹³C-NEFA returned to fasting non-enriched levels at 6 hours, suggesting that ¹³C-NEFA released from the hydrolysis of dietary ¹³C-TG were not spilled into the circulation but were taken up by peripheral tissue, for oxidation or storage (Fig 2B). By contrast, plasma ¹³C-NEFA remained elevated at the end of the 6 hours in the women with high apoB (2.64 ± 1.56 vs 0.06 ± 0.22 uM, $p= 0.014$, Fig 2B). There was however no difference in the rate of ¹³C-NEFA oxidation between the 2 groups, as both groups had identical percent of ¹³C-recovered in breath ¹³CO₂ over 6 hours (Fig 2C).

We further characterized the 2 group according to the number and size of apoB-lipoproteins. In the fasting state, ~ 1.0% of total apoB was recovered in the TRL fractions, with no group-differences in TRL concentrations or % of total apoB (Fig 3A). The group-difference in total apoB was secondary to differences in IDL/LDL ($p < 0.0001$), which represented ~ 99% in both groups. Women with high apoB also had higher fasting apoB48, which also represented an equivalent minor % of total apoB in both groups (~ 0.6%, Fig 3B). As would be expected, both TRL and apoB48-lipoproteins increased significantly at 4 hours postprandially in both groups; however their concentrations were higher in women with high apoB (Fig 3, Table inserts). Moreover, $iAUC_{6hrs}$ of plasma apoB48 was higher in women with high apoB, a difference that remained significant after correcting for fasting apoB48 (High vs low: 27.5 ± 3.7 vs 24.8 ± 3.5 mg/L, $p < 0.001$). However, similar to the fasting state, there was no group-difference in the % apoB in the form of apoB48 at 4 hours, and most of plasma apoB remained in the form of apoB100 as IDL/LDL (> 96%, Fig 3, Table inserts). Taken together this data suggests that women with high apoB have delayed dietary TRL clearance (chylomicron and VLDL), delayed hepatic TRL-remnant uptake, and increased VLDL production.

As apoE plays a major role in postprandial clearance of TRL/IDL, we measured the concentration of apoE in TRL and IDL/LDL fractions. Women with high apoB had higher TRL-apoE and IDL/LDL-apoE in both fasting (TRL= 0.27 ± 0.08 vs 0.09 ± 0.03 uM, IDL/LDL= 0.78 ± 0.06 vs 0.50 ± 0.05 uM, $p < 0.05$) and postprandial states (TRL= 0.72 ± 0.11 vs 0.28 ± 0.06 uM, IDL/LDL= 0.76 ± 0.07 vs 0.49 ± 0.04 uM, $p < 0.01$). However, correcting for total number of TRL (i.e. TRL-apoB) revealed that there was no group-difference in the enrichment of TRL with apoE in the fasting (high= 11.6 ± 1.6 vs low= 7.2 ± 1.8 uM apoE/uM apoB, *NS*) or the postprandial state (high= 14.2 ± 2.0 vs low= 12.8 ± 1.9 uM apoE/uM apoB, *NS*). There were also no significant postprandial changes in the enrichment of fasting TRL with apoE in either group. (*N.B.* analysis of the IDL/LDL enrichment with apoE was not conducted, as most of apoB is bound to LDL, which are poor in this transferable apolipoproteins).

In the whole group, mean LDL diameter correlated negatively with total plasma apoB and IDL/LDL-apoB ($r > -0.55$, $p < 0.01$) but not with TRL-apoB or apoB48. Total plasma apoB correlated positively with AUC of ^{13}C -TG ($r = 0.57$, $p = 0.006$) and ^{13}C -NEFA ($r = 0.46$, $p = 0.031$), as did fasting IDL/LDL-apoB with AUC of ^{13}C -TG only ($r = 0.51$, $p = 0.024$). There was no correlation between TRL-apoB, LDL diameter or the adipocyte area with AUC of ^{13}C -TG and ^{13}C -NEFA. Finally, there was also no correlation between plasma apoB or apoB48 with the adipocyte area.

***In situ* LPL activity *ex vivo* in women's WAT and in 3T3-L1 adipocytes:** The *in vivo* data suggest that the number of apoB-lipoprotein is inversely related to the hydrolysis of ^3H -TRL and the trapping of LPL-generated ^{13}C -NEFA in peripheral tissue. As WAT is the major site for dietary ^{13}C -TRL clearance, we examined the direct effects of LDL on the TRL-clearance by WAT. WAT samples were incubated for 4 hours with synthetic ^3H -TRL +/- each woman's own LDL. LDL was used as IDL/LDL were the most common form of apoB-lipoproteins (Fig 3), and unlike IDL do not represent an LPL-substrate for lack of apoC-II (LPL activator) (44). As presented in Figure 4A, plasma apoB correlated negatively with WAT ^3H -lipids, indicating lower ^3H -TRL hydrolysis and ^3H -NEFA uptake and trapping in WAT of women with high apoB ($r = -0.48$, $p = 0.050$). However, 4-hours treatment of the WAT with LDL did not affect WAT ^3H -lipids nor its association with plasma apoB (Fig 4A). Most of the ^3H -lipids were in the form of TG, as WAT ^3H -TG represented $83.2 \pm 6.5\%$ of the WAT ^3H -lipids. In parallel to the *in vivo* data, LDL treatment led to a significant reduction in the hydrolysis of the ^3H -TRL by WAT, whether examined in absolute values (baseline vs LDL: 81.7 ± 5.1 vs 75.6 ± 5.0 nmol TG/mg WAT, $p = 0.006$) or % changes (Fig 4B). Moreover, LDL treatment increased the accumulation of released ^3H -NEFA into the medium whether examined in absolute values (baseline vs LDL: 0.84 ± 0.20 vs 1.16 ± 0.26 nmol FA/mg WAT, $p = 0.015$) or % changes (Fig 4C). As a control, we measured background medium ^3H -NEFA after incubating the ^3H -TRL substrate for 4-hours in the absence of WAT, which was negligible ($0.69 \pm 0.01\%$) indicating that medium ^3H -NEFA was the result of ^3H -TRL hydrolysis. To explore whether the effect of LDL on medium-accumulation of NEFA was LPL-independent, we incubated WAT with

albumin-bound ^3H -FA. Plasma apoB did not correlate with WAT ^3H -lipids, but there was a trend for an inhibitory-effect of LDL-treatment on WAT ^3H -lipids (baseline vs LDL: 2.6 ± 0.4 vs 2.3 ± 0.3 nmol FA/mg WAT, $p= 0.062$). However, LDL treatment reduced the uptake of albumin-bound ^3H -FA by WAT, whether examined as absolute values (baseline vs LDL: 65.6 ± 4.8 vs 39.0 ± 5.9 nmol FA/mg WAT, $p < 0.0001$) or % change (Fig 4D). Notably, there was no correlation between adipocytes' size with WAT ^3H -lipids, ^3H -TG hydrolyzed or ^3H -FA uptake when the WAT samples were incubated with either ^3H -TRL or albumin-bound ^3H -FA.

To explore whether the LDL-induced inhibition of ^3H -TG hydrolysis was dependent on LPL activity, we examined the direct effect of LDL on LPL activity *in vitro*. LDL induced a dose-dependent inhibition of LPL activity of a purified LPL standard curve (maximum inhibition at 1 U of LPL= -24.7% with 0.6 g apoB /L LDL and - 43.6% with 1.2 g apoB /L LDL, $p < 0.0001$, Fig 5A). Similar results were observed using heparin-released LPL from 3T3-L1 adipocytes, with LDL inducing a maximum inhibition of - 29.4% with LDL of 1.2 g apoB/L (Fig 5B).

Finally, the negative correlation of plasma apoB with WAT ^3H -lipids suggest a chronic effect on WAT function. To extend this finding and explore whether chronic exposure to elevated concentrations of apoB-lipoproteins reduces adipocytes' function, we differentiated 3T3-L1 pre-adipocytes in the presence or absence of elevated, but physiological, concentrations of LDL (1.4 g apoB/L). Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes with LDL lead to morphological changes, as LDL-differentiated adipocytes appeared over-confluent compared to control adipocytes (Fig 5C). Nevertheless, following their 4-hours incubation with the ^3H -TRL, LDL-differentiated adipocytes had lower intracellular ^3H -lipids suggesting lower efficiency of ^3H -TRL hydrolysis and ^3H -NEFA trapping (Fig 5D). The inhibitory effect of LDL was not secondary to the reduction in cell viability as LDH released from the adipocytes was not affected by LDL-treatment over the 7-days of differentiation (Fig 5E).

V.6. Discussion

This study demonstrates that plasma clearance of dietary TG and NEFA is delayed in post-menopausal obese women with high plasma apoB without any difference in the oxidation rate of dietary NEFA, which suggests impaired trapping of NEFA in WAT. This *in vivo* finding was supported by *ex vivo* and *in vitro* evidence, as 1) plasma apoB was inversely related to *in situ* LPL activity and NEFA trapping in WAT, 2) LDL-treatment of WAT for 4 hours reduced the hydrolysis of synthetic TRL and decreased NEFA uptake into WAT, whether the source was LPL-released or albumin-bound NEFA, 3) LDL directly inhibited LPL activity, and 4) LDL-differentiated 3T3-L1 adipocytes had decreased *in situ* LPL activity and NEFA trapping.

Women with high apoB had reduced *in situ* LPL activity and NEFA trapping following the incubation of their WAT with ³H-TRL. In line with this, previous studies have demonstrated that adipocytes taken from patients with hyperapoB secondary to FCHL had reduced efficiency of NEFA esterification and TG synthesis (45), while their fibroblasts had reduced sensitivity to the postprandial lipogenic adipokine; acylation stimulating protein (46, 47). More recently, carbon dating studies by Arner et al have demonstrated that WAT of non-obese subjects with FCHL had reduced TG clearance and storage compared to healthy controls (48). While a cause-effect relationship cannot be determined from these association studies, including ours, this data led us to believe that chronic exposure of WAT to apoB-lipoproteins may be associated with reduced WAT function. Indeed, LDL-differentiated adipocytes had reduced *in situ* LPL activity and NEFA uptake; a hallmark of WAT dysfunction. In parallel, 3T3-L1 adipocytes differentiated with oxidized LDL were reported to have increased proliferation and decreased apoptotic rate and differentiation (20-22), an effect that was dependent on the binding and internalization of oxidized LDL to their scavenger receptor, CD36 (21). Thus as a complete turn-over of adipocytes is expected every 10 years (49, 50), we hypothesize that the chronic exposure of WAT to high concentrations of LDL *in vivo* promotes WAT dysfunction, an effect that persists *ex vivo* after the extraction of the adipocytes (45) or

WAT from the body. It should be pointed out however that the studies on oxidized LDL (21) suggest that binding and internalization of LDL to their surface receptors may be crucial for LDL effects on WAT function. This may explain why despite marked hyperapoB in patients with familial hypercholesterolemia, these patients are not expected to have reduced WAT function or postprandial hypertriglyceridemia given their reduced or absent LDL receptors.

Acute exposure of WAT to LDL for 4-hours also decreased TRL hydrolysis and NEFA uptake, whether the ^3H -NEFA form was LPL-released or albumin-bound. Controversially, this was not translated into decreased ^3H -lipids in WAT, which may however have been secondary to the large inter-subject variability in the responses of WAT to LDL and in the fate of ^3H -NEFA. Once taken up by WAT, ^3H -NEFA will mainly be targeted into oxidation or TG turnover pathways (i.e. continuous synthesis and breakdown of TG). Although there was no group-difference in the % of ingested ^{13}C recovered in breath CO_2 , energy expenditure *in vivo* may be reflective of substrate oxidation in non-adipose more than in adipose tissue; compared to in adipose tissue, energy expenditure was found to be ~ 98 folds higher per gram of heart and kidneys and ~ 2.9 folds higher per gram of skeletal muscle in obese women (51). Moreover, inter-subject variability may exist in TG and NEFA turnovers, which may be related or modulated by plasma apoB concentrations. Indeed, plasma apoB was reported to be negatively associated with noradrenaline-induced lipolysis (glycerol release) measured *ex vivo* in subcutaneous adipocytes of healthy obese men (52). In agreement, carbon dating data suggested that WAT from non-obese patients with hyperapoB secondary to FCHL have reduced TG turnover or increased TG age (48). Thus, it is possible in our study that incubation of WAT with LDL reduced both LPL-induced TRL hydrolysis as well as hormone-sensitive lipase-induced lipolysis, which would induce reduced ^3H -TRL hydrolysis and ^3H -NEFA uptake, without resulting in net significant changes in WAT ^3H -lipids. The effects of LDL on NEFA oxidation and TG/ NEFA turnover in WAT were however not examined in this study and warrant future investigation.

An obvious question would be how can LDL hinder TRL clearance? First, LDL receptors are key in the hepatic clearance of TRL and IDL by binding to their content of apoE (53). Although there were no group differences in the enrichment of TRL with apoE, and women with high apoB had higher not lower IDL/LDL-apoE, elevated LDL per se will hinder hepatic clearance of TRL and IDL by competitive binding to the LDL receptors. This is supported by increased concentrations of dietary TRL, measured as plasma apoB48, even in the fasting state in women with high apoB. Second, our data demonstrated that LDL have an inhibitory effect on LPL activity. This inhibitory effect of LDL on LPL may be direct as 1) each LDL particle was reported to bind up to 15 LPL dimers, a mechanism believed to facilitate the retention of LDL by macrophages in an atherosclerotic lesion (54, 55) and 2) phosphatidylcholine-containing liposomes were found to bind and compete out the binding of LDL to LPL (55); thus in contrast, LDL can compete out ³H-TRL binding to LPL. Alternatively, LDL may indirectly inhibit LPL activity by favoring the accumulation of NEFA in the plasma bathing WAT. NEFA were reported to associate with LDL in a concentration dependent manner following LDL-incubations with albumin bound-NEFA (0.25 – 2 mM) for 4 hours (56-58); conditions which parallel those used in our experiments. This is believed to be one mechanism responsible for the generation of electronegative or minimally modified/ oxidized LDL that characterize subjects with hypertriglyceridemia, type 2 diabetes and coronary heart disease (59). Binding of LDL to NEFA may not only reduce their availability for uptake by WAT, but may also hinder TRL clearance, as NEFA have well documented mechanisms by which they inhibit LPL activity. NEFA are reported to inhibit LPL secretion and transport from the adipocytes to the endothelial surface, displace LPL from the endothelial cell surface and interfere with LPL-binding to both its activator (apoC-II) and to its cell-membrane anchors (heparin sulfate proteoglycans) (60-66).

Finally, it should be noted that even though we propose that elevated concentrations of LDL reduce WAT function and hinder postprandial TRL and NEFA clearance, we do not believe that obesity per se will necessarily be affected by elevated LDL. Energy intake in excess of energy expenditure will eventually lead to obesity. The detrimental effects of

elevated plasma LDL on WAT function may however promote the development of metabolically unhealthy obese phenotype, by promoting ectopic fat storage and progressive systemic insulin resistance. Indeed, we previously have reported that post-menopausal women with hyperapoB (apoB > 1.2 g/L) have reduced insulin sensitivity (29). Moreover, we reported that the reduction in plasma apoB was the primary predictor of increased insulin sensitivity following a hypocaloric diet in the same population; independent of changes in weight, peripheral and central adiposity and plasma inflammatory markers (30). Indeed, since 2007, epidemiological studies have accumulated linking elevated plasma apoB to the development of type 2 diabetes over 6-10 years in a Turkish (67), Canadian (68) and Finnish (69) population, independent of central adiposity (67, 68) and glycemia (68). Thus, reduced WAT function, delayed postprandial TRL clearance, and increased insulin resistance in subjects with high apoB may provide a plausible mechanism for the increased incidence of type 2 diabetes in this population.

In conclusion, apoB-lipoproteins promote delayed plasma clearance of TRL and NEFA in vivo and ex vivo in subcutaneous WAT of post-menopausal obese women. We hypothesize that targeted reduction of plasma apoB may ameliorate subcutaneous WAT function, postprandial TRL clearance and risks for type 2 diabetes in humans.

V.7. Acknowledgements

We acknowledge the invaluable work of Dr. Remi Rabasa-Lhoret in subjects' screening, recruitment and medical follow-up. This work is supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) # 93581 to May Faraj. May Faraj is the recipient of New Investigator Award from CIHR and Leader's Opportunity Fund from Canadian Foundation for Innovation (CFI). Huda Salem and Nathalie Saint-Pierre are the recipients of Frederick Banting and Charles Best Canada Master's Award from CIHR. We thank Miguel Chagnon (Statistical department, Université de Montréal) for his advice on

the statistical analysis of the data. All authors have no conflict of interest with any of the presented work.

V.8. Reference List

1. Samra, J. S., M. L. Clark, S. M. Humphreys, I. A. Macdonald, K. N. Frayn. 1996. Regulation of lipid metabolism in adipose tissue during early starvation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **271**: E541-E546.
2. Frayn, K. N., S. W. Coppack, B. A. Fielding, S. M. Humphreys. 1995. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue *in vivo*: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv. Enzyme Reg.* **35**: 163-178.
3. Bickerton, A. S. T., R. Roberts, B. A. Fielding, L. Hodson, E. E. Blaak, A. J. M. Wagenmakers, M. Gilbert, F. Karpe, K. N. Frayn. 2007. Preferential Uptake of Dietary Fatty Acids in Adipose Tissue and Muscle in the Postprandial Period. *Diabetes.* **56**: 168-176.
4. Evans, K., G. C. Burdge, S. A. Wootton, M. L. Clark, K. N. Frayn. 2002. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes.* **51**: 2684-2690.
5. Faraj, M., H. L. Lu, K. Cianflone. 2004. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem. Cell Biol.* **82**: 170-190.
6. Yost, T. J., K. K. Froyd, D. R. Jensen, R. H. Eckel. 1995. Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* **44**: 786-790.

7. Frayn, K. N., S. M. Humphreys, S. W. Coppack. 1996. Net carbon flux across subcutaneous adipose tissue after a standard meal in normal-weight and insulin-resistant obese subjects. *Int. J. Obesity Rel. Metab. Dis.* **20**: 795-800.
8. Ginsberg, H. N., Y. Zhang, A. Hernandez-Ono. 2005. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch. Intern. Med.* **36**: 232-340.
9. de Graaf, J., M. Veerkamp, A. F. H. Stalenhoef. 2002. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J. R. Soc. Med.* **95**: 46-53.
10. Carpentier, A., S. D. Mittelman, R. N. Bergman, A. Giacca, G. F. Lewis. 1999. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **276**: E1055-E1066.
11. Lewis, G. F., A. Carpentier, K. Adeli, A. Giacca. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **23**: 201-229.
12. Sniderman, A. D., K. Cianflone, K. Frayn. 1997. The pathogenetic role of impaired fatty acid trapping by adipocytes in generating the pleiotropic features of hyperapoB. *Diabetologia.* **40**: S152-S154.
13. Zhang, Y. L., A. Hernandez-Ono, C. Ko, K. Yasunaga, L. S. Huang, H. N. Ginsberg. 2004. Regulation of Hepatic Apolipoprotein B-lipoprotein Assembly and Secretion by the Availability of Fatty Acids: I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *J. Biol. Chem.* **279**: 19362-19374.
14. Lewis, G. F. 1997. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**: 146-153.

15. Lewis, G. F., K. D. Uffelman, L. W. Szeto, G. Steiner. 1993. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. **42**: 833-842.
16. Malmstrom, R., C. J. Packard, M. Caslake, D. Bedford, P. Stewart, H. Yki-Jarvinen, J. Shepherd, M. R. Taskinen. 1997. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia*. **40**: 454-462.
17. Sniderman, A., S. Shapiro, D. Marpole, B. Skinner, B. Teng, P. O. Kwiterovich, Jr. 1980. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**: 604-608.
18. Sacks, F. M. 2006. The apolipoprotein story. *Atheroscler. Suppl*. **7**: 23-27.
19. Arner, P. 1997. Is familial combined hyperlipidaemia a genetic disorder of adipose tissue? *Curr. Opin. Lipidol*. **8**: 89-94.
20. Kuniyasu, A., S. Hayashi, H. Nakayama. 2002. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **295**: 319-323.
21. Masella, R., R. Vari, M. D'Archivio, C. Santangelo, B. Scazzocchio, M. T. Maggiorella, L. Sernicola, F. Titti, M. Sanchez, U. Di Mario, G. Leto, C. Giovannini. 2006. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett*. **580**: 2421-2429.
22. D'Archivio, M., B. Scazzocchio, C. Filesi, R. Vari, M. T. Maggiorella, L. Sernicola, C. Santangelo, C. Giovannini, R. Masella. 2008. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett*. **582**: 2291-2298.

23. Cianflone, K., M. Bilodeau, J. Davignon, A. D. Sniderman. 1990. Modulation of chylomicron remnant metabolism by an HMG CoA reductase inhibitor. *Metabolism*. **39**: 274-280.
24. Cabezas, M. C., T. W. de Bruin, H. Jansen, L. A. Kock, W. Kortlandt, D. W. Erkelens. 1993. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **13**: 804-814.
25. Bredie, S. J., T. W. de Bruin, P. N. Demacker, J. J. Kastelein, A. F. Stalenhoef. 1995. Comparison of gemfibrozil versus simvastatin in familial combined hyperlipidemia and effects on apolipoprotein-B- containing lipoproteins, low-density lipoprotein subfraction profile, and low-density lipoprotein oxidizability. *Am. J. Cardiol.* **75**: 348-353.
26. Castro Cabezas, M., C. Verseyden, S. Meijssen, H. Jansen, D. W. Erkelens. 2004. Effects of Atorvastatin on the Clearance of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Familial Combined Hyperlipidemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**: 5972-5980.
27. Genest, J., R. McPherson, J. Frohlich, T. Anderson, N. Campbell, A. Carpentier, P. Couture, R. Dufour, G. Fodor, G. Francis, S. Grover, M. Gupta, R. A. Hegele, D. C. Lau, L. Leiter, G. F. Lewis, E. Lonn, G. Mancini, D. Ng, G. Pearson, A. Sniderman, J. Stone, E. Ur. 2009. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can. J. Cardiol.* **25**: 567-579.
28. Weinsier, R. L., T. R. Nagy, G. R. Hunter, B. E. Darnell, D. D. Hensrud, H. L. Weiss. 2000. Do adaptive changes in metabolic rate favor weight regain in weight-reduced individuals? An examination of the set-point theory. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**: 1088-1094.

29. Faraj, M., L. Messier, J. P. Bastard, A. Tardif, A. Godbout, D. Prud'homme, R. Rabasa-Lhoret. 2006. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia*. **49**: 1637-1646.
30. Faraj, M., M.-E. Lavoie, L. Messier, J. P. Bastard, D. Prud'homme. 2010. Reduction in serum apoB is associated with reduced inflammation and insulin resistance in post-menopausal women: A MONET study. *Atherosclerosis*. **211**: 682-688.
31. Cunningham, J. J. 1990. Calculation of energy expenditure from indirect calorimetry: assessment of the Weir equation. *Nutrition*. **6**: 222-223.
32. Faraj, M., P. Jones, A. D. Sniderman, K. Cianflone. 2001. Enhanced dietary fat clearance in post-obese women. *J. Lipid Res*. **42**: 571-580.
33. Schectman, G., M. Patsches, E. A. Sasse. 1996. Variability in cholesterol measurements: comparison of calculated and direct LDL cholesterol determinations. *Clin. Chem*. **42**: 732-737.
34. Reyes-Soffer, G., S. Holleran, W. Karmally, C. I. Ngai, N. T. Chen, M. Torres, R. Ramakrishnan, W. S. Blaner, L. Berglund, H. N. Ginsberg, C. Tuck. 2009. Measures of postprandial lipoproteins are not associated with coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Lipid Res*. **50**: 1901-1909.
35. Vandermeersch, A., S. Ameye, D. Puype, D. Petitjean, M. De Buyzere, M. R. Langlois. 2010. Estimation of the low-density lipoprotein (LDL) subclass phenotype using a direct, automated assay of small dense LDL-cholesterol without sample pretreatment. *Clin. Chim. Acta*. **411**: 1361-1366.
36. Wassef, H., L. Bernier, J. Davignon, J. S. Cohn. 2004. Synthesis and Secretion of ApoC-I and ApoE during Maturation of Human SW872 Liposarcoma Cells. *J. Nutr*. **134**: 2935-2941.

37. Faraj, M., G. Beauregard, E. Loizon, M. Moldes, K. Clément, Y. Tahiri, K. Cianflone, H. Vidal, R. Rabasa-Lhoret. 2006. Insulin Regulation of Gene Expression and Concentrations of White Adipose Tissue-Derived Proteins in vivo in Healthy Men: Relation to Adiponutrin. *J. Endocrinol.* **191**: 427-435.
38. Moldes, M., G. Beauregard, M. Faraj, N. Peretti, P. H. Ducluzeau, M. Laville, R. Rabasa-Lhoret, H. Vidal, K. Clément. 2006. Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue. *Eur. J. Endocrinol.* 3-461.
39. Binnert, C., M. Laville, C. Pachiaudi, V. Rigalleau, M. Beylot. 1995. Use of gas chromatography/isotope ratio-mass spectrometry to study triglyceride metabolism in humans. *Lipids.* **30**: 869-873.
40. Binnert, C., C. Pachiaudi, M. Beylot, M. Croset, R. Cohen, J. P. Riou, M. Laville. 1996. Metabolic fate of an oral long-chain triglyceride load in humans. *Am. J. Physiol.* **270**: E445-E450.
41. Knuth, N., D. Remias, J. Horowitz. 2008. Adding carbohydrate to a high-fat meal blunts postprandial lipemia in women and reduces meal-derived fatty acids in systemic circulation. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **33**: 315-325.
42. Faraj, M., A. Sniderman, K. Cianflone. 2004. ASP enhances *in situ* lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J. Lipid Res.* **45**: 657-666.
43. Faraj, M., K. Cianflone. 2004. Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**: E150-E159.
44. Ginsberg, H. N. 1998. Lipoprotein physiology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **27**: 503-519.

45. Teng, B., A. Forse, M. A. Rodriguez, A. D. Sniderman. 1988. Adipose tissue glyceride synthesis in patients with hyperapobetalipoproteinemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **66**: 239-242.
46. Cianflone, K., M. Maslowska, A. D. Sniderman. 1990. Impaired response to fibroblasts in patients with hyperapobetalipoproteinemia to acylation stimulating protein. *J. Clin. Invest.* **85**: 722-730.
47. Zhang, X. J., K. Cianflone, J. Genest, A. D. Sniderman. 1998. Plasma acylation stimulating protein (ASP) as a predictor of impaired cellular biological response to ASP in patients with hyperapoB. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**: 730-739.
48. Arner, P., S. Bernard, M. Salehpour, G. Possnert, J. Liebl, P. Steier, B. A. Buchholz, M. Eriksson, E. Arner, H. Hauner, T. Skurk, M. Ryden, K. N. Frayn, K. L. Spalding. 2011. Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature.* **478**: 110-113.
49. Spalding, K. L., E. Arner, P. O. Westermark, S. Bernard, B. A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen, P. Arner. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* **453**: 783-787.
50. Arner, E., P. O. Westermark, K. L. Spalding, T. Britton, M. Ryden, J. Frisen, S. Bernard, P. Arner. 2010. Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes.* **59**: 105-109.
51. Wang, Z., Z. Ying, A. Bosity-Westphal, J. Zhang, M. Heller, W. Later, S. B. Heymsfield, M. J. Muller. 2012. Evaluation of Specific Metabolic Rates of Major Organs and Tissues: Comparison Between Nonobese and Obese Women. *Obesity.* **20**: 95-100.

52. Skogsberg, J., A. Dicker, M. Ryden, G. Astrom, R. Nilsson, H. Bhuiyan, S. Vitols, A. Mairal, D. Langin, P. Alberts, E. Walum, J. Tegner, A. Hamsten, P. Arner, J. Bjorkegren. 2008. ApoB100-LDL Acts as a Metabolic Signal from Liver to Peripheral Fat Causing Inhibition of Lipolysis in Adipocytes. *PLoS ONE*. **3**: e3771.
53. Williams, K. J., K. Chen. 2010. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**: 218-228.
54. Gustafsson, M., Le, M. n, Sk, K. en, Pe, J. an, Fr, V. en, t, P. Jirholt, S. O. Olofsson, S. Fazio, M. F. Linton, C. F. Semenkovich, G. Olivecrona, J. Boren. 2007. Retention of Low-Density Lipoprotein in Atherosclerotic Lesions of the Mouse. *Circ. Res.* **101**: 777-783.
55. Boren, J., A. Lookene, E. Makoveichuk, S. Xiang, M. Gustafsson, H. Liu, P. Talmud, G. Olivecrona. 2001. Binding of Low Density Lipoproteins to Lipoprotein Lipase Is Dependent on Lipids but Not on Apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* **276**: 26916-26922.
56. Benitez, S., J. L. Sanchez-Quesada, L. Lucero, R. Arcelus, V. Ribas, O. Jorba, A. Castellvi, E. Alonso, F. Blanco-Vaca, J. Ordonez-Llanos. 2002. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis*. **160**: 223-232.
57. Benitez, S., V. Villegas, C. Bancells, O. Jorba, F. Gonzalez-Sastre, J. Ordonez-Llanos, J. L. Sanchez-Quesada. 2004. Impaired Binding Affinity of Electronegative Low-Density Lipoprotein (LDL) to the LDL Receptor Is Related to Nonesterified Fatty Acids and Lysophosphatidylcholine Content. *Biochemistry*. **43**: 15863-15872.
58. Benitez, S., M. Camacho, R. Arcelus, S. Vila, C. Bancells, J. Ordonez-Llanos, J. L. Sanchez-Quesada. 2004. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty

acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells: Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis*. **177**: 299-305.

59. Mello, A. P. Q., I. T. da Silva, D. S. P. Abdalla, N. R. T. Damasceno. 2011. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*. **215**: 257-265.
60. Posner, I., J. DeSanctis. 1987. The effects of bovine serum albumin and oleic acid on rat pancreatic lipase and bovine milk lipoprotein lipase. *Comp. Biochem. Physiol. B*. **87**: 137-141.
61. Posner, I., J. DeSanctis. 1987. Kinetics of product inhibition and mechanisms of lipoprotein lipase activation by apolipoprotein C-II. *Biochemistry*. **26**: 3711-3717.
62. Amri, E. Z., L. Teboul, C. Vannier, P. A. Grimaldi, G. Ailhaud. 1996. Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J*. **314**: 541-546.
63. Saxena, U., I. J. Goldberg. 1990. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoproteins C-II: Effects of free fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*. **1043**: 161-168.
64. Saxena, U., L. D. Witte, I. J. Goldberg. 1989. Release of endothelial lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J. Biol. Chem*. **264**: 4349-4355.
65. Olivecrona, T., M. Bergh, M. Hultin, G. Olivecrona. 1995. Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can. J. Cardiol*. **11**: 73G-78G.
66. Sasaki, A., I. J. Goldberg. 1992. Lipoprotein lipase release from BFC-1 beta adipocytes. Effects of triglyceride-rich lipoproteins and lipolysis products. *J. Biol. Chem*. **267**: 15198-15204.

67. Onat, A., G. Can, G. Hergenc, M. Yazici, A. Karabulut, S. Albayrak. 2007. Serum apolipoprotein B predicts dyslipidemia, metabolic syndrome and, in women, hypertension and diabetes, independent of markers of central obesity and inflammation. *Int. J. Obes.* **31**: 1119-1125.
68. Ley, S. H., S. B. Harris, P. W. Connelly, M. Mamakeesick, J. Gittelsohn, T. M. Wolever, R. A. Hegele, B. Zinman, A. J. Hanley. 2010. Association of Apolipoprotein B with Incident Type 2 Diabetes in an Aboriginal Canadian Population. *Clin. Chem.* **56**: 666-670.
69. Salomaa, V., A. Havulinna, O. Saarela, T. Zeller, P. Jousilahti, A. Jula, T. Muenzel, A. Aromaa, A. Evans, K. Kuulasmaa, S. Blankenberg. 2010. Thirty-One Novel Biomarkers as Predictors for Clinically Incident Diabetes. *PLoS ONE*. **5**: e10100.

V.9. Figure legends

Figure 1: The postprandial changes in total plasma glucose (A), insulin (B), triglyceride (C) and non-esterified fatty acids (D) following the ingestion of ¹³C-triolein labelled high-fat meal in women with high and low plasma apoB. Groups' differences were analyzed by repeated-measures 2-way ANOVA.

Figure 2: The postprandial changes in plasma ¹³C-triglyceride (A), plasma ¹³C-non esterified fatty acid (B), and % ¹³C dose recovered in breath CO₂ (C) in women with high and low plasma apoB. Group differences were analyzed by non-parametric Wilcoxon-rank sum test. * for p < 0.05

Figure 3: FPLC-fractioned apoB-lipoproteins at fasting and postprandial states (graphs) and the sum of apoB concentrations in each fraction (table) (A), the concentrations of apoB48 at fasting and postprandial states (graph and Table) in women with high and low apoB. * for p < 0.05, ** for p < 0.01 for group differences and \$ for p < 0.01 for intra-group differences.

Figure 4: The correlation of plasma apoB with WAT ³H-lipids (A), % LDL-inhibition of ³H-TRL hydrolysis following 4-hours incubation of WAT with ³H-TRL (B), % LDL-mediated accumulation of LPL-released ³H-NEFA in the medium following 4-hours incubation of WAT with ³H-TRL (C), LDL-inhibition of ³H-NEFA uptake following the incubation of WAT with ³H-NEFA: albumin (D), LDL inhibition of LPL standard-curve activity (E), and LDL inhibition of 3T3-L1 adipocytes'-associated LPL activity released by a heparin wash (F).

Figure 5: The morphology of 3T3-L1 adipocytes differentiated with or without LDL (1.4 g apoB/L) (A), intracellular ³H-lipids following 4-hours incubation with ³H-TRL (B), and lactate dehydrogenase released during differentiation with or without LDL (toxicity assay) (C).

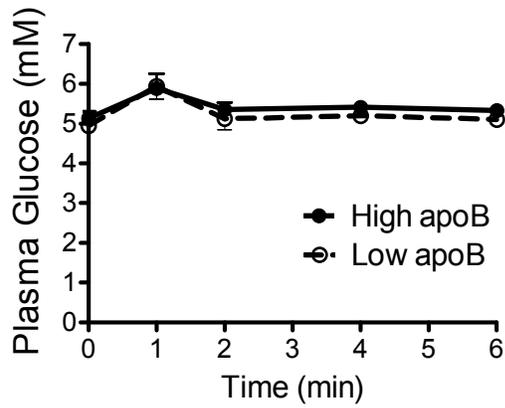
Table 1. Baseline characteristics of the post-menopausal women examined (N=11/ group).

	Low apoB	High apoB
ApoB (g/L)	0.73 ± 0.16	1.20 ± 0.27**
Age (years)	59.1 ± 1.2	58.8 ± 1.9
Weight (kg)	79.2 ± 3.0	71.8 ± 3.1
BMI (kg/m ²)	31.9 ± 1.2	30.2 ± 1.1
BSA (m ²)	1.80 ± 0.04	1.69 ± 0.04
Waist (cm)	102.6 ± 3.2	101.6 ± 2.2
LBM (kg)	40.0 ± 1.0	36.9 ± 1.1
Fat Mass (kg)	36.1 ± 2.7	32.0 ± 2.2
Android fat (kg)	3.4 ± 0.3	3.1 ± 0.2
Gynoid fat (kg)	6.6 ± 0.5	5.8 ± 0.5
Adipocyte's area (um ²)	3145 ± 153	3086 ± 287
BMR (kcal/day)	1292 ± 40	1205 ± 33
SBP (mmHg)	113 ± 5	120 ± 5
DBP (mmHg)	76 ± 3	77 ± 2
Plasma Glucose (mM)	4.9 ± 0.1	5.1 ± 0.2
Plasma Insulin (μU/mL)	14.5 ± 1.7	12.9 ± 1.8
Plasma TC (mM)	5.0 ± 0.1	6.8 ± 0.3**
Plasma LDL-C (mM)	2.8 ± 0.1	4.5 ± 0.2**
Plasma HDL-C (mM)	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Plasma TG (mM)	1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.3*
Plasma NEFA (mM)	0.62 ± 0.04	0.56 ± 0.05
Plasma apoB48 (mg/L)	3.56 ± 0.42	8.34 ± 1.47**
LDL diameter (Å)	271 ± 1	267 ± 2*

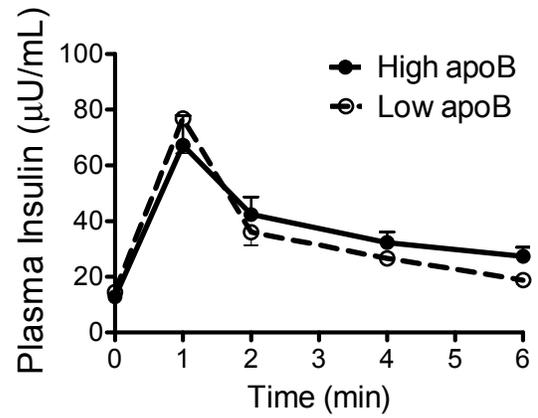
* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ for group difference by unpaired t-test.

Figure 1.

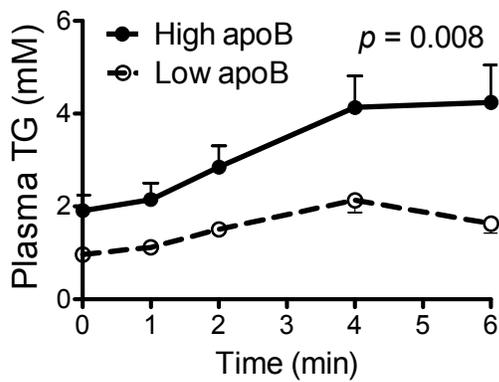
A.



B.



C.



D.

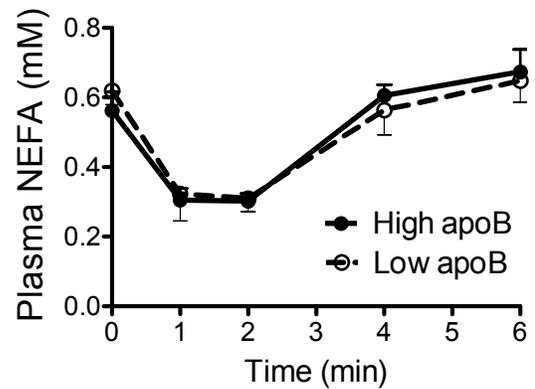


Figure 2.

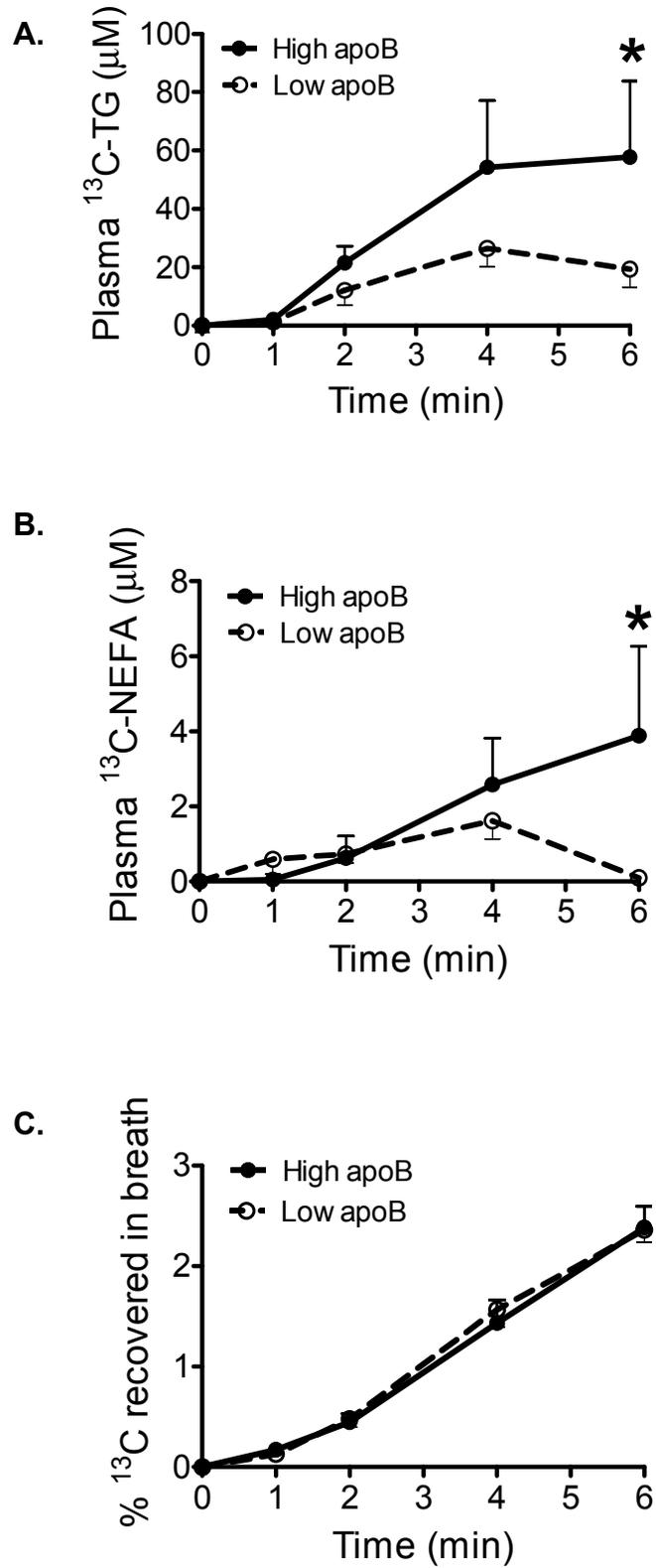
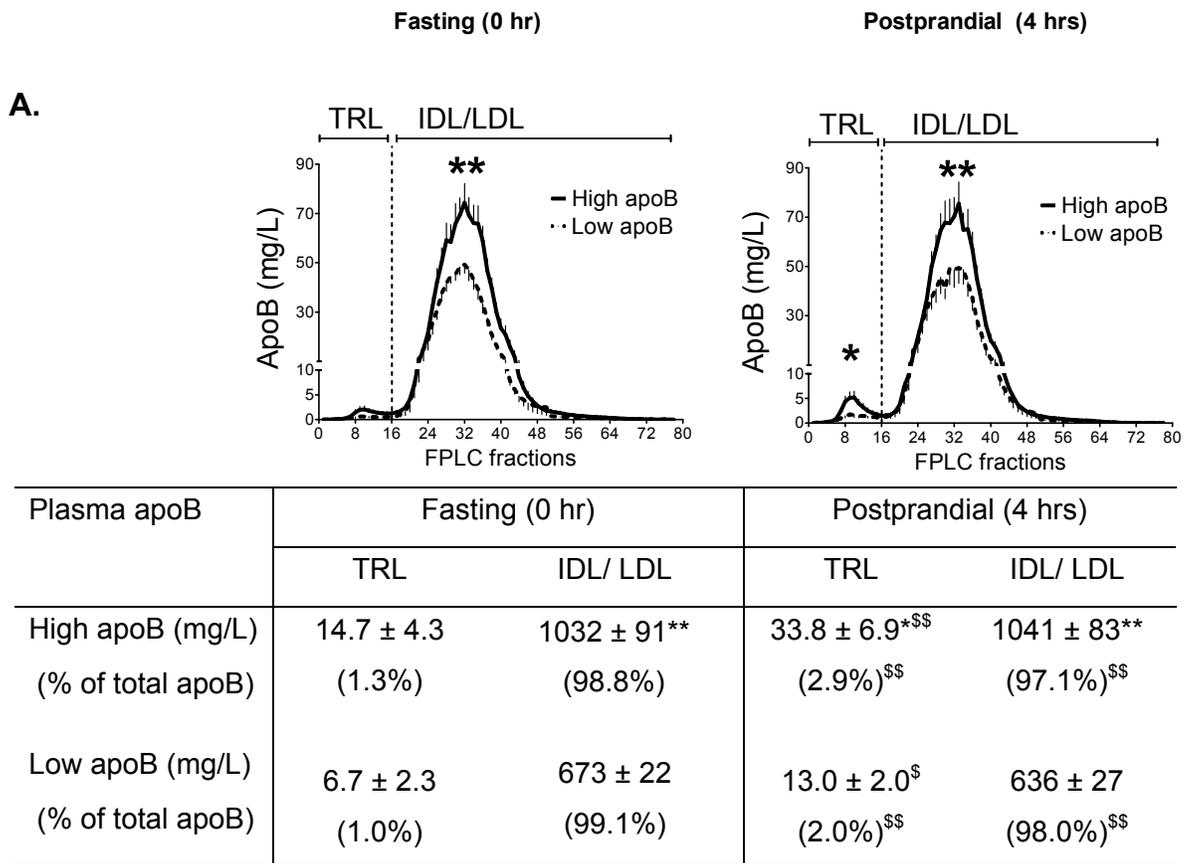
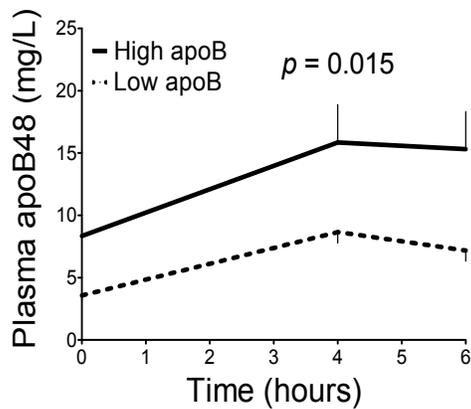


Figure 3.

**B.**

Plasma apoB48	Fasting (0 hr)	Postprandial (4 hrs)
High apoB (mg/L)	8.3 ± 1.5**	15.9 ± 3.0*\$\$
(% of total apoB)	(0.73%)	(1.46%)\$\$
Low apoB (mg/L)	3.6 ± 0.4	8.7 ± 0.9\$\$
(% of total apoB)	(0.50%)	(1.29%)\$\$

Figure 4.

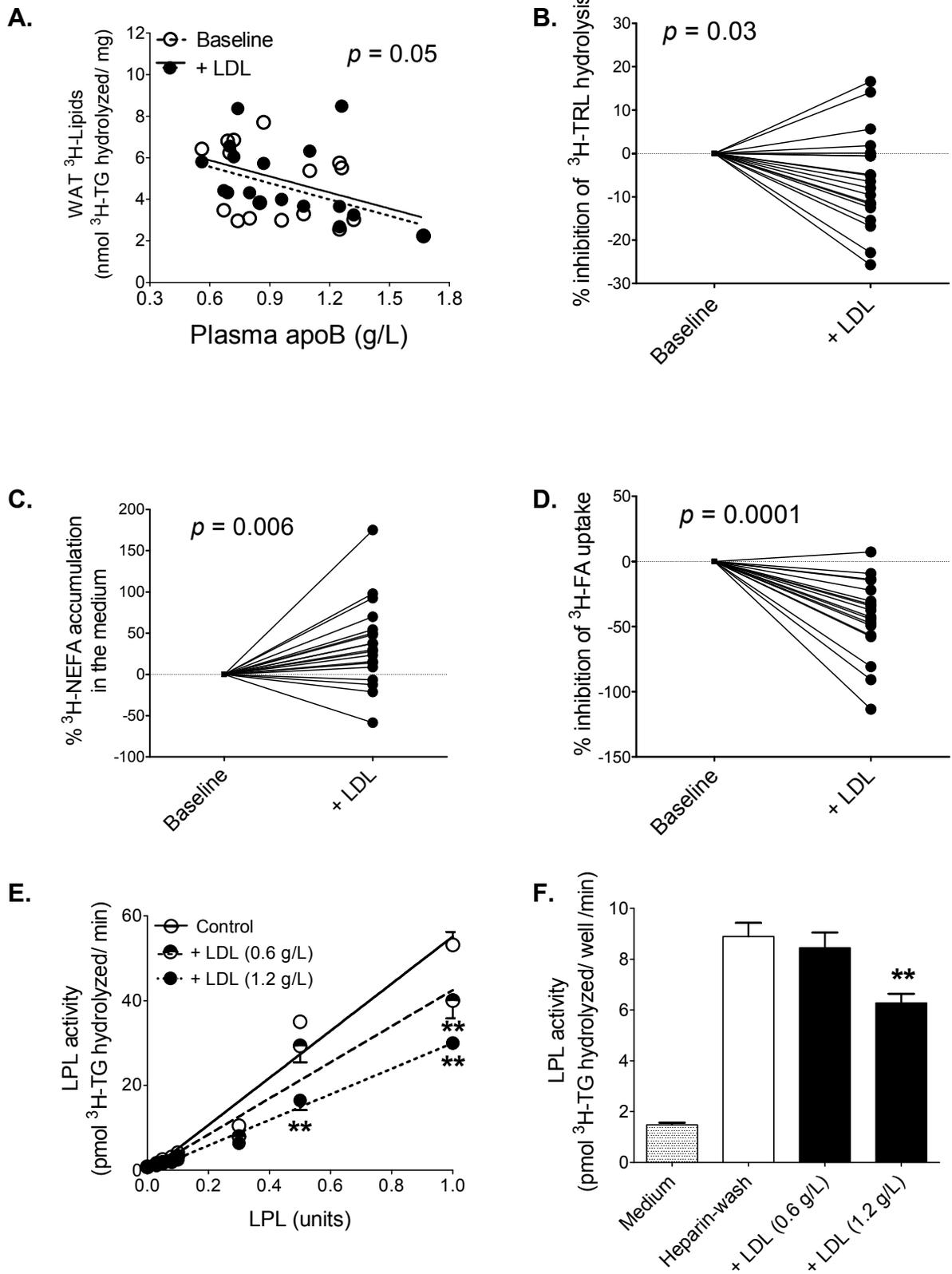
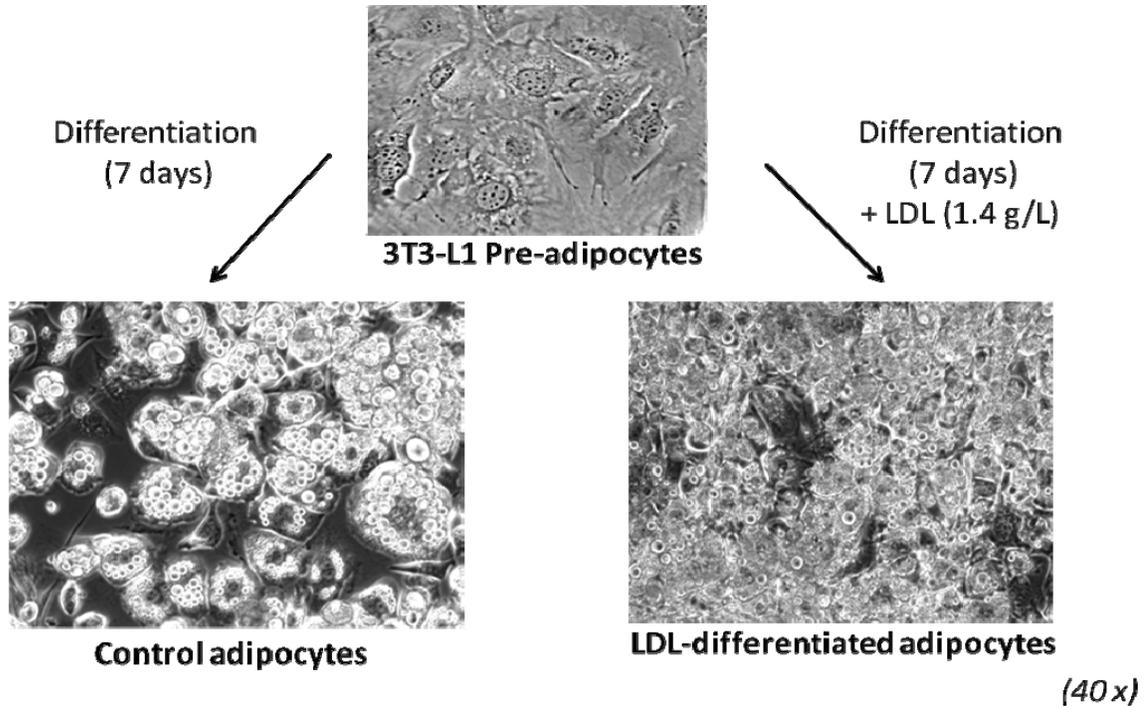
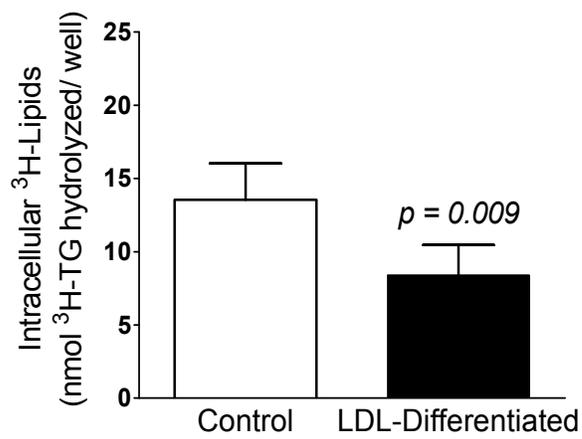


Figure 5

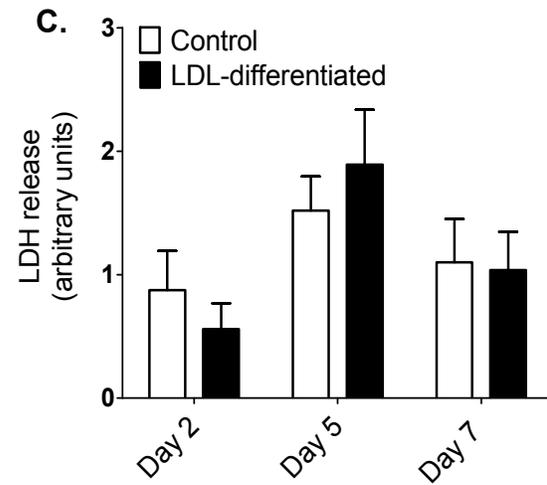
A.



B.



C.



Chapitre VI. Autres publications

Revue : *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Research*

Titre : White Adipose Tissue Apolipoprotein C-I Secretion Relation to Delayed Plasma Clearance of Dietary Fat in Humans

Auteurs : Wassef Hanny, Salem Huda, Bissonnette Simon, Baass Alexis, Dufour Robert, Davignon Jean, Faraj May

État : Publié 20/09/2012

Objective : White adipose tissue (WAT) dysfunction is characterized by delayed clearance of dietary triglyceride-rich lipoproteins (TRL). We reported that apolipoprotein (apo) C-I, a transferable apolipoprotein that inhibits lipoprotein lipase activity when bound to TRL, was produced by a human adipocyte model. Thus, we aimed to determine whether increased WAT apoC-I secretion is related to delayed dietary fat clearance in humans.

Methods and results : After the ingestion of a ^{13}C -triolein-labeled high-fat meal, postmenopausal obese women with high-fasting WAT apoC-I secretion (median >0.81 $\mu\text{mol/L}$ per g/4 hours, $n=9$) had delayed postprandial plasma clearance of ^{13}C -triglyceride and ^{13}C -nonesterified fatty acids over 6 hours compared with controls. WAT apoC-I secretion over 4 hours correlated with fasting total and non-high-density lipoprotein apoC-I but not with high-density lipoprotein apoC-I and was the primary predictor of 4-hour postprandial increases in TRL apoC-I. Correction for TRL apoC-I eliminated the association of WAT apoC-I with 6-hour area under the curve of plasma ^{13}C -triglyceride; correction for insulin sensitivity or inflammation did not. Finally, in addition to apoC-I, WAT secreted considerable amount of apoC-II, apoC-III, and apoE over 24 hours; however, only WAT apoC-I secretion was associated with 6-hour area under the curve of plasma ^{13}C -triglyceride.

Conclusions : Increased WAT apoC-I secretion in obese women is associated with delayed postprandial dietary fat clearance mediated by increased TRL apoC-I. Thus, we hypothesize that reducing WAT apoC-I secretion ameliorates WAT dysfunction and associated cardiometabolic risks in humans.

Chapitre VII. Discussion et conclusion

VII.1. Discussion

L'objectif de ce mémoire était de démontrer que la clairance des TG par le TAB est affectée par des niveaux élevés d'apoB plasmatique. À cet effet, trois modèles ont permis de démontrer :

- Une corrélation entre les niveaux d'apoB plasmatique et la clairance des TG et AGNE postprandiaux chez des femmes post-ménopausées obèses soumises à un repas riche en TG;
- Une corrélation entre les niveaux d'apoB plasmatique et la réduction de la fonction de biopsies *ex vivo* de TAB, mesuré par les niveaux intracellulaires de lipides-³H après une incubation de 4 heures en présence de lipoprotéines riches en TG-³H;
- Un effet causal de l'ajout du LDL sur la réduction de la fonction du TAB, mesuré par une diminution de l'hydrolyse de lipoprotéines riches en TG-³H, et sur la réduction de la captation d'AGNE résultants de l'hydrolyse ou liés à l'albumine;
- Un effet causal chronique du LDL dans la fonction adipeuse, évalué par la réduction de l'hydrolyse et de la captation de lipoprotéines riches en TG-³H des adipocytes 3T3-L1 matures différencié en présence ou absence de LDL.

Les résultats ayant déjà été discutés dans l'article publié, la présente discussion vise à élaborer les implications éventuelles de ces découvertes sur les thérapies actuelles et sur la compréhension des maladies métaboliques.

Précédemment, notre équipe a rapporté une réduction de la sensibilité à l'insuline chez des femmes post-ménopausées avec apoB élevé (6). Les travaux de ce mémoire s'inscrivent dans la logique que des niveaux élevés d'apoB augmentent cette résistance par le mécanisme suivant : l'apoB entraîne une réduction de la fonction de clairance des acides gras dans le TAB, ce qui mène à une lipotoxicité dans les tissus périphériques déterminants dans la sensibilité à l'insuline, notamment le muscle et le foie.

Comme présenté précédemment, il est déjà connu que les niveaux élevés de TG plasmatiques sous forme de chylomicrons ou de VLDL mènent à une augmentation de la sécrétion hépatique d'apoB-lipoprotéines et donc une des niveaux d'apoB élevés (128). La compétition subséquente pour la LPL mène à l'hypertriglycéridémie postprandiale (77). Comme les résultats présentés dans l'article ci-haut supportent l'hypothèse que les niveaux élevés d'apoB-lipoprotéines entraînent une diminution de la clairance postprandiale des TG, ceci entraînerait un mécanisme de rétroaction positive sur le nombre de particules d'apoB en circulation. En résumé, le mauvais captage des TG entraîne une augmentation de l'apoB, mais l'apoB entraîne aussi un mauvais captage des TG (voir figure 2).

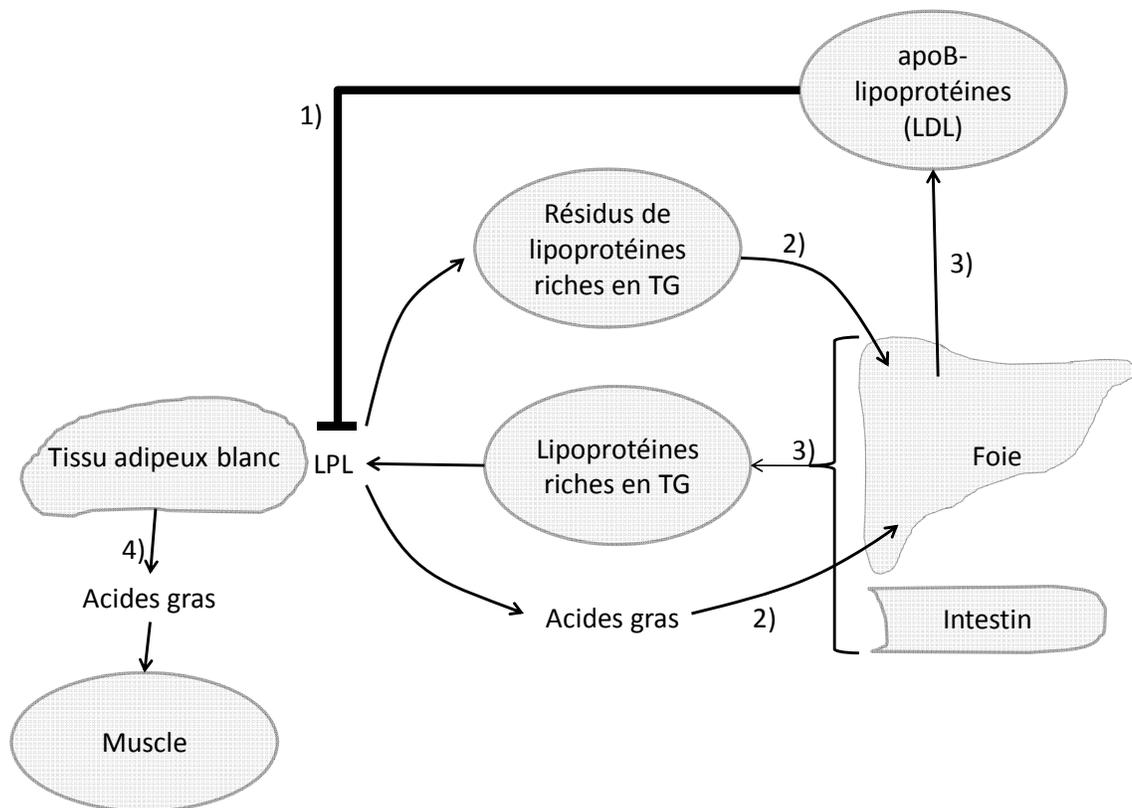


Figure 2 : Effets du mauvais captage des acides gras par le tissu adipeux blanc. Les niveaux élevés de LDL entraînent 1) une réduction de l'hydrolyse et du captage des

lipoprotéines riches en triglycérides par le tissu adipeux blanc. Ceci mène à 2) une augmentation de la captation des triglycérides et des acides gras non-estérifiés en circulation par le foie et 3) leur resécrétion sous forme d'apoB-lipoprotéine, participant ainsi à une élévation de l'apoB plasmatique. Aussi, les acides gras non-estérifiés hydrolysés par la lipoprotéine lipase sont 4) redirigés vers le muscle, induisant la résistance à l'insuline.

Légende : flèche en gras, nouveau mécanisme d'inhibition identifié

Abbréviations : lipoprotéine lipase, LPL ; lipase hépatique, HL ; récepteur de la lipoprotéine de basse densité, LDLR ; *LDLR-related protein*, LRP ; lipoprotéine de très basse densité, VLDL ; lipoprotéine de densité intermédiaire, IDL ; lipoprotéine de basse densité, LDL. Source : (23)

Une étude récente de notre équipe a démontré que, suite à une intervention hypocalorique chez des femmes postménopausées obèses, l'association de la résistance à l'insuline avec l'apoB est supérieure à celle avec l'inflammation, alors que cette dernière est déjà connue pour promouvoir la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (6). De plus, dans cette même étude, c'est la réduction de l'apoB qui prédit le mieux la réduction de la résistance à l'insuline, indépendamment des marqueurs inflammatoires : orosomucoïde, haptoglobine, CRPhs. Ainsi, la réduction d'apoB pourrait promouvoir la réduction de la résistance à l'insuline, et ce secondairement à une amélioration de la fonction adipeuse des sujets en surpoids soumis à une perte de poids. Ainsi, les résultats de cette étude, combinés à ceux du présent mémoire, suggèrent que cibler les sujets avec apoB élevé pourrait permettre une meilleure prévention du diabète de type 2 chez les sujets obèses.

D'autres modifications comportementales telles l'exercice ou les thérapies par hypolipidémiant pourraient entraîner une réduction de l'apoB. En fait, les résultats de ce mémoire suggèrent un nouveau mécanisme par lequel l'exercice prévient le diabète de type 2. Parmi les multiples bénéfices associés à l'exercice, on observe la diminution de l'apoB,

alors que les niveaux de LDL-C restent stables (129). Il est connu que l'exercice contribue à maintenir ou diminuer les TG plasmatiques à jeun (130) et postprandiaux (131). D'ailleurs, l'exercice augmente la sensibilité à l'insuline et l'utilisation de substrat dans les muscles squelettiques, menant à un moindre flux d'acides gras vers le foie et réduisant conséquemment la sécrétion d'apoB-lipoprotéines (132, 133). La moindre compétition pour l'attache à la LPL est un mécanisme expliquant la diminution de la lipémie postprandiale mesurée chez les athlètes (134). Il semblerait toutefois que cette amélioration soit un effet à court terme, comme l'ont démontré les études de désentraînement (135). Les résultats de ce mémoire supportant un effet néfaste des hauts niveaux d'apoB-lipoprotéines sur la fonction adipeuse, leur diminution lors de l'exercice est un autre mécanisme pouvant expliquer la réduction du risque de développer le diabète de type 2 et les dyslipidémies.

D'un autre côté, l'administration de statines est la thérapie la plus efficace pour diminuer les niveaux d'apoB, atteignant 19 à 42% de réduction dans les essais randomisés contrôlés majeurs (43). L'utilisation des statines entraîne la réduction du LDL-C via l'inhibition de sa synthèse endogène et l'augmentation du nombre de LDLR sur la membrane cellulaire, menant ainsi à une réduction des apoB-lipoprotéines plasmatiques, bien que cette réduction soit moindre que celle du LDL-C (136). De plus, les statines entraînent une augmentation du nombre de récepteurs au LDL dans les tissus périphériques, surtout dans le foie (137). Il a été démontré que la réduction de l'apoB par les statines entraîne parallèlement une amélioration de la clairance des TG postprandiaux (138-140), ce qui concorde avec la meilleure clairance des sujets avec apoB bas observée dans notre étude.

Toutefois, la relation entre la prise de statines et le risque de développer le diabète de type 2 est controversée. Bien qu'une étude précédente, l'étude WOSCOPS, avait démontré que les patients sous statines ont un risque relatif de développer le diabète de 0.7 (141, 142), deux analyses *post-hoc* récentes, sur les cohortes JUPITER (143) et PROSPER (144), ont démontré l'association inverse. Le mécanisme expliquant cette augmentation du risque de diabète de type 2 est encore méconnu et semble à premier abord en contradiction

avec les résultats de ce mémoire. En effet, si le nombre de particules de LDL est diminué chez les patients sous statines, comment se fait-il que le risque de diabète puisse augmenter? La prise de statines entraîne une augmentation du nombre de LDLR en surface cellulaire aussi accompagnée d'une induction des niveaux intracellulaires et circulants de *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9) (145). Celle-ci est une glycoprotéine sécrétée qui interagit avec le récepteur LDL et mène à son inactivation et sa dégradation lysosomale, contrebalancant partiellement l'augmentation du nombre de LDLR induit par les statines (146, 147). L'inhibition de la PCSK9 mène à une augmentation des niveaux de LDLR sur la membrane cellulaire, permettant une captation augmentée des particules contenant l'apoB (148). Compte tenu des effets néfastes présentés dans ce mémoire des particules contenant l'apoB sur la fonction du tissu adipeux, il est concevable que le corps humain possède des mécanismes qui empêchent la captation exagérée des particules contenant l'apoB par le tissu adipeux. La PCSK9 pourrait être un candidat intéressant à ces mécanismes. Dallas *et al* ont observé qu'alors que la prise d'oestrogènes n'augmente pas les niveaux de PCSK9 circulants chez des femmes postménopausées, les niveaux circulants de PCSK9 corrélaient positivement avec les niveaux de glucose, d'insuline et le HOMA-IR (149). Si des études supplémentaires évaluaient l'effet causal de la PCSK9 sur la sensibilité à l'insuline, l'existence même de ce mécanisme de protection du tissu adipeux contre les niveaux circulants de LDL apporterait ainsi un mécanisme plausible de l'augmentation du diabète de type 2 chez les patients sous statines. De plus, la prise de statines entraîne une diminution de l'oxydation des gras chez des hommes âgés en surpoids alors que les niveaux circulants d'AGNE sont plus élevés (150), ce qui s'expliquerait par une diminution de la captation des gras par le tissu adipeux brun. Il est toutefois à noter que l'augmentation de l'incidence de diabète de type 2 est un effet secondaire potentiel à court et moyen terme qui est largement compensé par les bénéfices cardiovasculaires obtenus par la prise de statines (151).

De façon similaire aux statines, des traitements de seconde ligne diminuant les concentrations d'apoB, dont le LDL, entraînent aussi une réduction des TG plasmatiques. En inhibant sélectivement l'internalisation du cholestérol par le *Niemann-Pick C1 Like 1*

dans les entérocytes (152), l'ézétimibe diminue l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire. Ceci mène à une réduction des niveaux de cholestérol total, de LDL-C et d'apoB plasmatique (153, 154). L'administration d'ézétimibe concomitante à celle de statines a été associée à une amélioration de la clairance postprandiale des TG comparativement à celle de statines seules (155). Des études sur les souris CD36KO et *wild type* ont démontré que cet effet de l'ézétimibe s'effectue via une réduction du contenu en TG des chylomicrons et des résidus de chylomicrons (156). Les fibrates offrent une réduction de l'apoB et des TG plasmatiques supérieures aux statines, mais ont un effet moindre sur le LDL-C (157). Ces médicaments sont des ligands synthétiques de PPARalpha, ce qui entraîne une activation des gènes activant le métabolisme intracellulaire des acides gras, telle ceux de la bêta-oxidation, de l'oméga-hydroxylation et de la kétogénèse. La coadministration avec l'ézétimibe semble une stratégie intéressante pour réduire davantage les niveaux de LDL-C, non-HDL-C et d'apoB chez les patients diabétiques (158).

La niacine, aussi appelée vitamine B3, a été popularisée grâce à ses effets bénéfiques sur les niveaux de HDL-C circulants. Elle diminue aussi les niveaux d'apoB et de LDL-C circulants (43). Elle est habituellement utilisée afin de réduire le risque résiduel suite aux statines (159) en diminuant la synthèse du VLDL et LDL (160). Toutefois, son administration a été associée à l'apparition d'un diabète temporaire chez les patients (161). Il a été rapporté que l'utilisation de la niacine augmente la glycémie à jeun et la résistance à l'insuline selon des mécanismes actuellement inconnus. À noter, ces effets sont temporellement associés aux bouffées vasomotrices (161), qui sont causées par une activation et une désensibilisation du récepteur couplé aux protéines G, GPR109A (162). L'action principale de la niacine est attribuée à son implication dans les coenzymes NAD et NADP, impliqués dans la respiration cellulaire, le métabolisme des lipides et la glycogénolyse (43, 163). Il est possible que les effets bénéfiques sur le métabolisme des lipides soient une conséquence de changement d'utilisation des substrats dans les cellules, favorisant plutôt le métabolisme des lipides au détriment de celui des glucides et donc augmentant la résistance à l'insuline, ici mesurée par les niveaux de glucose circulants.

Dans un autre ordre d'idées, certaines dyslipoprotéïnémies sont associées à des niveaux élevés d'apoB-lipoprotéines en circulation. L'hypercholestérolémie familiale (FH) n'est pas associée à une augmentation du risque de développer le diabète de type 2 malgré des niveaux trop élevés d'apoB. En effet, cette maladie génétique est caractérisée par une dysfonction du LDLR, menant à un catabolisme réduit des particules contenant l'apoB100 (164). Le LDL s'accumule particulièrement dans cette condition ; l'absence d'apoE en surface empêche le LRP d'en assurer le catabolisme. On observe ainsi des niveaux élevés de LDL-C chez ces patients, typiquement supérieurs à 4.9 mM, la présence de xanthomes tendineux et une athérosclérose précoce et sévère (21). La faible prévalence de diabète de type 2 chez les patients FH malgré la présence d'apoB élevée suggère que les particules de LDL ne peuvent pas exercer leur effet néfaste sur la fonction du tissu adipeux démontré dans ce mémoire. En regard avec les résultats de ce mémoire, cette observation supporte l'importance potentielle du LDLR dans la pathophysiologie précoce du diabète de type 2. À l'inverse, l'hyperlipidémie combinée familiale (FCHL) est une dyslipidémie associée à une augmentation du risque de diabète de type 2 (165). L'élévation des TG et du cholestérol survient avec des nombres élevés de particules de VLDL et/ou LDL. Selon le patient, différentes étiologies expliquent ces paramètres plasmatiques : diminution de la fonction du TAB et de l'activité de la LPL, de la LCAT et/ou de la lipase hépatique, tous pointant vers un métabolisme altéré des TG. Contrairement aux patients FH, le LDLR est ici fonctionnel, permettant l'effet délétère du LDL sur la fonction du TAB. Rétablir la capacité du tissu adipeux d'effectuer la clairance des TG semble donc tout indiqué chez ces patients. À cet effet, la diminution ciblée des niveaux d'apoB plasmatique grâce aux thérapies agressives par diète, drogues et activité physique pourrait contribuer à rétablir les autres paramètres lipidiques et ainsi diminuer les risques cardiovasculaires et les comorbidités.

VII.2. Conclusion

Ce mémoire a démontré que les apoB-lipoprotéines sont associées à une diminution de la clairance des TG et AGNE *in vivo* chez les femmes obèses postménopausées. *Ex vivo*,

les biopsies de TAB de participantes avec apoB plasmatique élevé ont une moindre hydrolyse et captation de lipoprotéines riches en TG, et l'ajout de LDL durant l'incubation entraîne une réduction de la fonction d'hydrolyse et de captage des acides gras. Les expériences *in vitro* ont permis de démontrer l'effet direct du LDL dans l'inhibition de l'activité de la LPL et indirects sur la réduction de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG par les adipocytes différenciés en présence de LDL.

Cet effet néfaste du LDL à court et long terme sur la fonction adipeuse favorise donc l'accumulation des TG et AGNE dans le plasma, menant potentiellement à une lipotoxicité dans les tissus périphériques. La réduction des niveaux d'apoB-lipoprotéines pourrait donc être un mécanisme améliorant la fonction du TAB et la clairance postprandiale des lipoprotéines riches en TG, prévenant donc l'hypertriglycémie et le diabète de type 2 chez les femmes obèses postménopausées.

Bibliographie

1. Leroith, D. 2012. Pathophysiology of the metabolic syndrome: implications for the cardiometabolic risks associated with type 2 diabetes. *The American journal of the medical sciences* 343: 13-16.
2. Cole, T. J., and T. Lobstein. 2012. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr Obes* 7: 284-294.
3. Blackburn, P., I. Lemieux, B. Lamarche, J. Bergeron, P. Perron, G. Tremblay, D. Gaudet, and J. P. Despres. 2012. Hypertriglyceridemic waist: a simple clinical phenotype associated with coronary artery disease in women. *Metabolism* 61: 56-64.
4. Miller, M., N. J. Stone, C. Ballantyne, V. Bittner, M. H. Criqui, H. N. Ginsberg, A. C. Goldberg, W. J. Howard, M. S. Jacobson, P. M. Kris-Etherton, T. A. Lennie, M. Levi, T. Mazzone, and S. Pennathur. 2011. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 123: 2292-2333.
5. Faraj, M., L. Messier, J. P. Bastard, A. Tardif, A. Godbout, D. Prud'homme, and R. Rabasa-Lhoret. 2006. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. *Diabetologia* 49: 1637-1646.
6. Faraj, M., M. E. Lavoie, L. Messier, J. P. Bastard, and D. Prud'homme. 2010. Reduction in serum apoB is associated with reduced inflammation and insulin resistance in post-menopausal women: A MONET study. *Atherosclerosis* 211: 682-688.
7. Masella, R., R. Vari, M. D'Archivio, C. Santangelo, B. Scazzocchio, M. T. Maggiorella, L. Sernicola, F. Titti, M. Sanchez, U. Di Mario, G. Leto, and C. Giovannini. 2006. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett* 580: 2421-2429.

8. Innis, S. M. 2011. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 2: 275-283.
9. Glatz, J. F., J. J. Luiken, and A. Bonen. 2010. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90: 367-417.
10. Yosefy, C., J. R. Viskoper, D. Varon, Z. Ilan, D. Pilpel, G. Lugassy, R. Schneider, N. Savyon, Y. Adan, and A. Raz. 1996. Repeated fasting and refeeding with 20:5, n-3 eicosapentaenoic acid (EPA): a novel approach for rapid fatty acid exchange and its effect on blood pressure, plasma lipids and hemostasis. *Journal of human hypertension* 10 Suppl 3: S135-139.
11. Ginsberg, H. N. 1998. Lipoprotein physiology. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 27: 503-519.
12. Lambert, J. E., and E. J. Parks. 2012. Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochimica et biophysica acta* 1821: 721-726.
13. El Harchaoui, K., W. A. van der Steeg, E. S. Stroes, and J. J. Kastelein. 2007. The role of CETP inhibition in dyslipidemia. *Current atherosclerosis reports* 9: 125-133.
14. Dougherty, P. J., and R. R. Arora. 2012. Utility of early high dose statins in acute coronary syndrome. *American journal of therapeutics* 19: 369-376.
15. Kunnen, S., and M. Van Eck. 2012. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J Lipid Res* 53: 1783-1799.
16. Hammad, S. M. 2011. Blood sphingolipids in homeostasis and pathobiology. *Adv Exp Med Biol* 721: 57-66.

17. Rutledge, A. C., Q. Su, and K. Adeli. 2010. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochem Cell Biol* 88: 251-267.
18. Kei, A. A., T. D. Filippatos, V. Tsimihodimos, and M. S. Elisaf. 2012. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism* 61: 906-921.
19. Kolovou, G. D., and K. K. Anagnostopoulou. 2007. Apolipoprotein E polymorphism, age and coronary heart disease. *Ageing research reviews* 6: 94-108.
20. Soran, H., S. Hama, R. Yadav, and P. N. Durrington. 2012. HDL functionality. *Curr Opin Lipidol* 23: 353-366.
21. Kolovou, G. D., P. M. Kostakou, and K. K. Anagnostopoulou. 2011. Familial hypercholesterolemia and triglyceride metabolism. *International journal of cardiology* 147: 349-358.
22. Charlton-Menys, V., and P. Durrington. 2006. Apolipoproteins AI and B as therapeutic targets. *J Intern Med* 259: 462-472.
23. Davignon, J., and R. Dufour. 2007. *Primary Hyperlipidemias: An Atlas of Investigation and Diagnosis* Clinical Publishing, Oxford, United Kingdom.
24. Wassef, H., H. Salem, S. Bissonnette, A. Baass, R. Dufour, J. Davignon, and M. Faraj. 2012. White Adipose Tissue Apolipoprotein C-I Secretion Relation to Delayed Plasma Clearance of Dietary Fat in Humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.
25. Alipour, A., P. Valdivielso, J. W. Elte, H. W. Janssen, J. Rioja, N. van der Meulen, R. van Mechelen, T. L. Njo, P. Gonzalez-Santos, A. P. Rietveld, and M. C. Cabezas.

2012. Exploring the value of apoB48 as a marker for atherosclerosis in clinical practice. *Eur J Clin Invest* 42: 702-708.
26. Yu, K. C., and A. D. Cooper. 2001. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6: D332-354.
27. Bishop, J. R., K. I. Stanford, and J. D. Esko. 2008. Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 19: 307-313.
28. Davis, R. A. 1999. Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. *Biochimica et biophysica acta* 1440: 1-31.
29. Fisher, E. A., and H. N. Ginsberg. 2002. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 277: 17377-17380.
30. Dixon, J. L., and H. N. Ginsberg. 1993. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res* 34: 167-179.
31. Young, S. G., B. S. Davies, L. G. Fong, P. Gin, M. M. Weinstein, A. Bensadoun, and A. P. Beigneux. 2007. GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Curr Opin Lipidol* 18: 389-396.
32. Havel, R. J., V. G. Shore, B. Shore, and D. M. Bier. 1970. Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase. *Circulation research* 27: 595-600.
33. Zheng, C., K. Ikewaki, B. W. Walsh, and F. M. Sacks. 2006. Metabolism of apoB lipoproteins of intestinal and hepatic origin during constant feeding of small amounts of fat. *J Lipid Res* 47: 1771-1779.

34. Ginsberg, H. N. 1991. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care* 14: 839-855.
35. Merck. 2010. Normal laboratory values. In *The Merck Manual*.
36. Hokanson, J. E., R. M. Krauss, J. J. Albers, M. A. Austin, and J. D. Brunzell. 1995. LDL physical and chemical properties in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15: 452-459.
37. Nigon, F., P. Lesnik, M. Rouis, and M. J. Chapman. 1991. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J Lipid Res* 32: 1741-1753.
38. DeJager, S., E. Bruckert, and M. J. Chapman. 1993. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 34: 295-308.
39. Schuster, B., R. Prassl, F. Nigon, M. J. Chapman, and P. Laggner. 1995. Core lipid structure is a major determinant of the oxidative resistance of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2509-2513.
40. Lund-Katz, S., P. M. Laplaud, M. C. Phillips, and M. J. Chapman. 1998. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 37: 12867-12874.
41. Sniderman, A., K. Williams, and J. de Graaf. 2010. Non-HDL C equals apolipoprotein B: except when it does not! *Curr Opin Lipidol* 21: 518-524.
42. Sacks, F. M. 2006. The apolipoprotein story. *Atheroscler Suppl* 7: 23-27.
43. Jacobson, T. A. 2011. Opening a new lipid "apo-theary": incorporating apolipoproteins as potential risk factors and treatment targets to reduce cardiovascular risk. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 86: 762-780.

44. Brunzell, J. D., M. Davidson, C. D. Furberg, R. B. Goldberg, B. V. Howard, J. H. Stein, and J. L. Witztum. 2008. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus conference report from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Journal of the American College of Cardiology* 51: 1512-1524.
45. Fredrickson, D. S., and R. S. Lees. 1965. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation* 31: 321-327.
46. Faraj, M., P. Jones, A. D. Sniderman, and K. Cianflone. 2001. Enhanced dietary fat clearance in postobese women. *J Lipid Res* 42: 571-580.
47. Onat, A., G. Can, G. Hergenc, M. Yazici, A. Karabulut, and S. Albayrak. 2007. Serum apolipoprotein B predicts dyslipidemia, metabolic syndrome and, in women, hypertension and diabetes, independent of markers of central obesity and inflammation. *Int J Obes (Lond)* 31: 1119-1125.
48. Ley, S. H., S. B. Harris, P. W. Connelly, M. Mamakeesick, J. Gittelsohn, T. M. Wolever, R. A. Hegele, B. Zinman, and A. J. Hanley. 2010. Association of apolipoprotein B with incident type 2 diabetes in an aboriginal Canadian population. *Clinical chemistry* 56: 666-670.
49. Davidson, M. H. 2010. Update on CETP inhibition. *Journal of clinical lipidology* 4: 394-398.
50. Cziraky, M. J., K. E. Watson, and R. L. Talbert. 2008. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *Journal of managed care pharmacy : JMCP* 14: S3-28; quiz S30-21.
51. Leite, J. O., and M. L. Fernandez. 2010. Should we take high-density lipoprotein cholesterol levels at face value? *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 10: 1-3.

52. Cronin, C. G., P. Prakash, G. H. Daniels, G. W. Boland, M. K. Kalra, E. F. Halpern, E. L. Palmer, and M. A. Blake. 2012. Brown fat at PET/CT: correlation with patient characteristics. *Radiology* 263: 836-842.
53. Simonson, D. C., and R. A. DeFronzo. 1990. Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. *Am J Physiol* 258: E399-412.
54. Gallagher, D., S. B. Heymsfield, M. Heo, S. A. Jebb, P. R. Murgatroyd, and Y. Sakamoto. 2000. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 72: 694-701.
55. Thompson, D., F. Karpe, M. Lafontan, and K. Frayn. 2012. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol Rev* 92: 157-191.
56. Fruhbeck, G. 2008. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 456: 1-22.
57. Lundbom, J., A. Hakkarainen, N. Lundbom, and M. R. Taskinen. 2012. Deep subcutaneous adipose tissue is more saturated than superficial subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*.
58. Rosen, E. D., and O. A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.
59. D., L., G. Fruhbeck, K. Frayn, and M. Lafontan. 2009. Adipose tissue: development, anatomy and functions. In *Obesity: Science to Practice*. F. G. Williams G, editor. Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 79-108.
60. Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156.

61. Fu, M., T. Sun, A. L. Bookout, M. Downes, R. T. Yu, R. M. Evans, and D. J. Mangelsdorf. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 19: 2437-2450.
62. Darlington, G. J., S. E. Ross, and O. A. MacDougald. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
63. Spalding, K. L., E. Arner, P. O. Westermark, S. Bernard, B. A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen, and P. Arner. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783-787.
64. Strawford, A., F. Antelo, M. Christiansen, and M. K. Hellerstein. 2004. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $2H_2O$. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E577-588.
65. Bays, H. E., J. M. Gonzalez-Campoy, G. A. Bray, A. E. Kitabchi, D. A. Bergman, A. B. Schorr, H. W. Rodbard, and R. R. Henry. 2008. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert review of cardiovascular therapy* 6: 343-368.
66. Farese, R. V., Jr., and T. C. Walther. 2009. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139: 855-860.
67. Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266: 11341-11346.
68. Belfrage, P., G. Fredrikson, H. Olsson, and P. Stralfors. 1985. Molecular mechanisms for hormonal control of adipose tissue lipolysis. *International journal of obesity* 9 Suppl 1: 129-135.

69. Ahmadian, M., Y. Wang, and H. S. Sul. 2010. Lipolysis in adipocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42: 555-559.
70. Lafontan, M., and D. Langin. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research* 48: 275-297.
71. Bartness, T. J., and C. K. Song. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J Lipid Res* 48: 1655-1672.
72. Wang, T. J. 2012. The natriuretic peptides and fat metabolism. *N Engl J Med* 367: 377-378.
73. Jensen, M. D. 2007. Adipose tissue metabolism -- an aspect we should not neglect? *Horm Metab Res* 39: 722-725.
74. Schulz, H. 1991. Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica et biophysica acta* 1081: 109-120.
75. Lopaschuk, G. D., and J. Gamble. 1994. The 1993 Merck Frosst Award. Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1101-1109.
76. Frigolet, M. E., V. E. Ramos Barragan, and M. Tamez Gonzalez. 2011. Low-carbohydrate diets: a matter of love or hate. *Annals of nutrition & metabolism* 58: 320-334.
77. Evans, K., G. C. Burdge, S. A. Wootton, M. L. Clark, and K. N. Frayn. 2002. Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* 51: 2684-2690.

78. da Rocha, E. E., V. G. Alves, and R. B. da Fonseca. 2006. Indirect calorimetry: methodology, instruments and clinical application. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 9: 247-256.
79. Breckenridge, W. C., J. A. Little, G. Steiner, A. Chow, and M. Poapst. 1978. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med* 298: 1265-1273.
80. Cox, D. W., W. C. Breckenridge, and J. A. Little. 1978. Inheritance of apolipoprotein C-II deficiency with hypertriglyceridemia and pancreatitis. *N Engl J Med* 299: 1421-1424.
81. Kirchgessner, T. G., R. C. LeBoeuf, C. A. Langner, S. Zollman, C. H. Chang, B. A. Taylor, M. C. Schotz, J. I. Gordon, and A. J. Lusis. 1989. Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci both distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression. *J Biol Chem* 264: 1473-1482.
82. Eisenberg, S., E. Sehayek, T. Olivecrona, and I. Vlodavsky. 1992. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest* 90: 2013-2021.
83. Ioka, R. X., M. J. Kang, S. Kamiyama, D. H. Kim, K. Magoori, A. Kamataki, Y. Ito, Y. A. Takei, M. Sasaki, T. Suzuki, H. Sasano, S. Takahashi, J. Sakai, T. Fujino, and T. T. Yamamoto. 2003. Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *J Biol Chem* 278: 7344-7349.
84. Beigneux, A. P., B. S. Davies, P. Gin, M. M. Weinstein, E. Farber, X. Qiao, F. Peale, S. Bunting, R. L. Walzem, J. S. Wong, W. S. Blaner, Z. M. Ding, K. Melford, N. Wongsiriroj, X. Shu, F. de Sauvage, R. O. Ryan, L. G. Fong, A. Bensadoun, and S.

- G. Young. 2007. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* 5: 279-291.
85. Davies, B. S., A. P. Beigneux, R. H. Barnes, 2nd, Y. Tu, P. Gin, M. M. Weinstein, C. Nobumori, R. Nyren, I. Goldberg, G. Olivecrona, A. Bensadoun, S. G. Young, and L. G. Fong. 2010. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab* 12: 42-52.
86. Wong, H., D. Yang, J. S. Hill, R. C. Davis, J. Nikazy, and M. C. Schotz. 1997. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5594-5598.
87. Peterson, J., W. Y. Fujimoto, and J. D. Brunzell. 1992. Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res* 33: 1165-1170.
88. Olivecrona, T., G. Liu, M. Hultin, and G. Bengtsson-Olivecrona. 1993. Regulation of lipoprotein lipase. *Biochemical Society transactions* 21: 509-513.
89. Goldberg, I. J., C. A. Scheraldi, L. K. Yacoub, U. Saxena, and C. L. Bisgaier. 1990. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 265: 4266-4272.
90. Merkel, M., B. Loeffler, M. Kluger, N. Fabig, G. Geppert, L. A. Pennacchio, A. Laatsch, and J. Heeren. 2005. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 280: 21553-21560.
91. Wang, H., and R. H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E271-288.

- 92.Semenkovich, C. F., M. Wims, L. Noe, J. Etienne, and L. Chan. 1989. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264: 9030-9038.
- 93.Robciuc, M. R., E. Tahvanainen, M. Jauhiainen, and C. Ehnholm. 2010. Quantitation of serum angiopoietin-like proteins 3 and 4 in a Finnish population sample. *J Lipid Res* 51: 824-831.
- 94.Sasaki, A., and I. J. Goldberg. 1992. Lipoprotein lipase release from BFC-1 beta adipocytes. Effects of triglyceride-rich lipoproteins and lipolysis products. *J Biol Chem* 267: 15198-15204.
- 95.Peterson, J., B. E. Bihain, G. Bengtsson-Olivecrona, R. J. Deckelbaum, Y. A. Carpentier, and T. Olivecrona. 1990. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 909-913.
- 96.Posner, I., and J. DeSanctis. 1987. Kinetics of product inhibition and mechanisms of lipoprotein lipase activation by apolipoprotein C-II. *Biochemistry* 26: 3711-3717.
- 97.Saxena, U., and I. J. Goldberg. 1990. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II: effects of free-fatty-acids. *Biochimica et biophysica acta* 1043: 161-168.
- 98.Magnan, C. 2006. Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 20: 108-113.
- 99.Blanchette-Mackie, E. J., and R. O. Scow. 1983. Movement of lipolytic products to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study. *J Lipid Res* 24: 229-244.

100. Hamilton, J. a. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy? *Journal of lipid research* 39: 467-481.
101. Schaffer, J. E. 2002. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E239-246.
102. Schaffer, J. E., and H. F. Lodish. 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79: 427-436.
103. Lobo, S., B. M. Wiczer, A. J. Smith, A. M. Hall, and D. A. Bernlohr. 2007. Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J Lipid Res* 48: 609-620.
104. Kamp, F., and J. A. Hamilton. 2006. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 75: 149-159.
105. Watkins, P. A., J. Pevsner, and S. J. Steinberg. 1999. Human very long-chain acyl-CoA synthetase and two human homologs: initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 60: 323-328.
106. Pei, Z., P. Fraisl, J. Berger, Z. Jia, S. Forss-Petter, and P. A. Watkins. 2004. Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J Biol Chem* 279: 54454-54462.
107. Coleman, R. A., T. M. Lewin, C. G. Van Horn, and M. R. Gonzalez-Baro. 2002. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr* 132: 2123-2126.

108. Yen, C. L., S. J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, and R. V. Farese, Jr. 2008. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49: 2283-2301.
109. Bansal, S., J. E. Buring, N. Rifai, S. Mora, F. M. Sacks, and P. M. Ridker. 2007. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 298: 309-316.
110. Bays, H. E., B. Laferrere, J. Dixon, L. Aronne, J. M. Gonzalez-Campoy, C. Apovian, and B. M. Wolfe. 2009. Adiposopathy and bariatric surgery: is 'sick fat' a surgical disease? *International journal of clinical practice* 63: 1285-1300.
111. Ginsberg, H. N., Y. L. Zhang, and A. Hernandez-Ono. 2005. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 36: 232-240.
112. Sniderman, A. D., K. Cianflone, and K. Frayn. 1997. The pathogenetic role of impaired fatty acid trapping by adipocytes in generating the pleiotropic features of hyperapoB. *Diabetologia* 40 Suppl 2: S152-154.
113. Lewis, G. F. 1997. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* 8: 146-153.
114. Zhang, Y. L., A. Hernandez-Ono, C. Ko, K. Yasunaga, L. S. Huang, and H. N. Ginsberg. 2004. Regulation of hepatic apolipoprotein B-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *J Biol Chem* 279: 19362-19374.
115. Skogsberg, J., A. Dicker, M. Ryden, G. Astrom, R. Nilsson, H. Bhuiyan, S. Vitols, A. Mairal, D. Langin, P. Alberts, E. Walum, J. Tegner, A. Hamsten, P. Arner, and J. Bjorkegren. 2008. ApoB100-LDL acts as a metabolic signal from liver to peripheral fat causing inhibition of lipolysis in adipocytes. *PLoS One* 3: e3771.

116. Kuniyasu, A., S. Hayashi, and H. Nakayama. 2002. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 319-323.
117. Goldberg, I. J., R. H. Eckel, and N. A. Abumrad. 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res* 50 Suppl: S86-90.
118. Endemann, G., L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White, and A. A. Protter. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 268: 11811-11816.
119. Podrez, E. A., E. Poliakov, Z. Shen, R. Zhang, Y. Deng, M. Sun, P. J. Finton, L. Shan, B. Gugu, P. L. Fox, H. F. Hoff, R. G. Salomon, and S. L. Hazen. 2002. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 277: 38503-38516.
120. Febbraio, M., D. P. Hajjar, and R. L. Silverstein. 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108: 785-791.
121. D'Archivio, M., B. Scaccocchio, C. Filesi, R. Vari, M. T. Maggiora, L. Sernicola, C. Santangelo, C. Giovannini, and R. Masella. 2008. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett* 582: 2291-2298.
122. Genest, J., R. McPherson, J. Frohlich, T. Anderson, N. Campbell, A. Carpentier, P. Couture, R. Dufour, G. Fodor, G. A. Francis, S. Grover, M. Gupta, R. A. Hegele, D. C. Lau, L. Leiter, G. F. Lewis, E. Lonn, G. B. Mancini, D. Ng, G. J. Pearson, A. Sniderman, J. A. Stone, and E. Ur. 2009. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and

- prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *The Canadian journal of cardiology* 25: 567-579.
123. Cunningham, J. J. 1990. Calculation of energy expenditure from indirect calorimetry: assessment of the Weir equation. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 6: 222-223.
124. Faraj, M., G. Beauregard, E. Loizon, M. Moldes, K. Clement, Y. Tahiri, K. Cianflone, H. Vidal, and R. Rabasa-Lhoret. 2006. Insulin regulation of gene expression and concentrations of white adipose tissue-derived proteins in vivo in healthy men: relation to adiponutrin. *J Endocrinol* 191: 427-435.
125. Moldes, M., G. Beauregard, M. Faraj, N. Peretti, P. H. Ducluzeau, M. Laville, R. Rabasa-Lhoret, H. Vidal, and K. Clement. 2006. Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 155: 461-468.
126. Faraj, M., A. D. Sniderman, and K. Cianflone. 2004. ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J. Lipid Res.* 45: 657-666.
127. Faraj, M., and K. Cianflone. 2004. Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E150-159.
128. Adiels, M., S. O. Olofsson, M. R. Taskinen, and J. Boren. 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28: 1225-1236.
129. Holme, I., A. T. Hostmark, and S. A. Anderssen. 2007. ApoB but not LDL-cholesterol is reduced by exercise training in overweight healthy men. Results from the 1-year randomized Oslo Diet and Exercise Study. *J Intern Med* 262: 235-243.

130. Dufaux, B., G. Assmann, and W. Hollmann. 1982. Plasma lipoproteins and physical activity: a review. *International journal of sports medicine* 3: 123-136.
131. Cohen, J. C., T. D. Noakes, and A. J. Benade. 1989. Postprandial lipemia and chylomicron clearance in athletes and in sedentary men. *Am J Clin Nutr* 49: 443-447.
132. Malkova, D., A. E. Hardman, R. J. Bowness, and I. A. Macdonald. 1999. The reduction in postprandial lipemia after exercise is independent of the relative contributions of fat and carbohydrate to energy metabolism during exercise. *Metabolism* 48: 245-251.
133. Gill, J. M., K. N. Frayn, S. A. Wootton, G. J. Miller, and A. E. Hardman. 2001. Effects of prior moderate exercise on exogenous and endogenous lipid metabolism and plasma factor VII activity. *Clin Sci (Lond)* 100: 517-527.
134. Merrill, J. R., R. G. Holly, R. L. Anderson, N. Rifai, M. E. King, and R. DeMeersman. 1989. Hyperlipemic response of young trained and untrained men after a high fat meal. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 9: 217-223.
135. Gill, J. M., and A. E. Hardman. 2003. Exercise and postprandial lipid metabolism: an update on potential mechanisms and interactions with high-carbohydrate diets (review). *J Nutr Biochem* 14: 122-132.
136. Evans, M., A. Roberts, S. Davies, and A. Rees. 2004. Medical lipid-regulating therapy: current evidence, ongoing trials and future developments. *Drugs* 64: 1181-1196.
137. Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.

138. Cianflone, K., M. Bilodeau, J. Davignon, and A. D. Sniderman. 1990. Modulation of chylomicron remnant metabolism by an hepatic hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Metabolism* 39: 274-280.
139. Castro Cabezas, M., C. Verseyden, S. Meijssen, H. Jansen, and D. W. Erkelens. 2004. Effects of atorvastatin on the clearance of triglyceride-rich lipoproteins in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5972-5980.
140. Bredie, S. J., T. W. de Bruin, P. N. Demacker, J. J. Kastelein, and A. F. Stalenhoef. 1995. Comparison of gemfibrozil versus simvastatin in familial combined hyperlipidemia and effects on apolipoprotein-B-containing lipoproteins, low-density lipoprotein subfraction profile, and low-density lipoprotein oxidizability. *The American journal of cardiology* 75: 348-353.
141. Freeman, D. J., J. Norrie, N. Sattar, R. D. Neely, S. M. Cobbe, I. Ford, C. Isles, A. R. Lorimer, P. W. Macfarlane, J. H. McKillop, C. J. Packard, J. Shepherd, and A. Gaw. 2001. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 103: 357-362.
142. Rajpathak, S. N., D. J. Kumbhani, J. Crandall, N. Barzilai, M. Alderman, and P. M. Ridker. 2009. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 32: 1924-1929.
143. Ridker, P. M., E. Danielson, F. A. Fonseca, J. Genest, A. M. Gotto, Jr., J. J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A. J. Lorenzatti, J. G. MacFadyen, B. G. Nordestgaard, J. Shepherd, J. T. Willerson, and R. J. Glynn. 2008. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 359: 2195-2207.

144. Shepherd, J., G. J. Blauw, M. B. Murphy, E. L. Bollen, B. M. Buckley, S. M. Cobbe, I. Ford, A. Gaw, M. Hyland, J. W. Jukema, A. M. Kamper, P. W. Macfarlane, A. E. Meinders, J. Norrie, C. J. Packard, I. J. Perry, D. J. Stott, B. J. Sweeney, C. Twomey, and R. G. Westendorp. 2002. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 1623-1630.
145. Dubuc, G., A. Chamberland, H. Wassef, J. Davignon, N. G. Seidah, L. Bernier, and A. Prat. 2004. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24: 1454-1459.
146. Zhang, D. W., T. A. Lagace, R. Garuti, Z. Zhao, M. McDonald, J. D. Horton, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2007. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 282: 18602-18612.
147. Lagace, T. A., D. E. Curtis, R. Garuti, M. C. McNutt, S. W. Park, H. B. Prather, N. N. Anderson, Y. K. Ho, R. E. Hammer, and J. D. Horton. 2006. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 116: 2995-3005.
148. Ason, B., S. Tep, H. R. Davis, Jr., Y. Xu, G. Tetzloff, B. Galinski, F. Soriano, N. Dubinina, L. Zhu, A. Stefanni, K. K. Wong, M. Tadin-Strapps, S. R. Bartz, B. Hubbard, M. Ranalletta, A. B. Sachs, W. M. Flanagan, A. Strack, and N. A. Kuklin. 2011. Improved efficacy for ezetimibe and rosuvastatin by attenuating the induction of PCSK9. *J Lipid Res* 52: 679-687.

- 149.Lakoski, S. G., T. A. Lagace, J. C. Cohen, J. D. Horton, and H. H. Hobbs. 2009. Genetic and Metabolic Determinants of Plasma PCSK9 Levels. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94: 2537-2543.
- 150.Limprasertkul, A., N. M. Fisher, A. B. Awad, and D. R. Pendergast. 2012. Statin Therapy Depresses Fat Metabolism in Older Individuals. *Journal of the American College of Nutrition* 31: 32-38.
- 151.Watts, G. F., and E. M. Ooi. 2012. Balancing the cardiometabolic benefits and risks of statins. *Lancet* 380: 541-543.
- 152.Ge, L., J. Wang, W. Qi, H. H. Miao, J. Cao, Y. X. Qu, B. L. Li, and B. L. Song. 2008. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab* 7: 508-519.
- 153.Stein, E., S. Stender, P. Mata, P. Sager, D. Ponsonnet, L. Melani, L. Lipka, R. Suresh, D. Maccubbin, and E. Veltri. 2004. Achieving lipoprotein goals in patients at high risk with severe hypercholesterolemia: efficacy and safety of ezetimibe co-administered with atorvastatin. *American heart journal* 148: 447-455.
- 154.McKenney, J. M., M. Farnier, K. W. Lo, H. E. Bays, I. Perevokaya, G. Carlson, M. J. Davies, Y. B. Mitchel, and B. Gumbiner. 2006. Safety and efficacy of long-term co-administration of fenofibrate and ezetimibe in patients with mixed hyperlipidemia. *Journal of the American College of Cardiology* 47: 1584-1587.
- 155.Hajer, G. R., G. M. Dallinga-Thie, L. C. van Vark-van der Zee, and F. L. Visseren. 2009. The effect of statin alone or in combination with ezetimibe on postprandial lipoprotein composition in obese metabolic syndrome patients. *Atherosclerosis* 202: 216-224.
- 156.Sandoval, J. C., Y. Nakagawa-Toyama, D. Masuda, Y. Tochino, H. Nakaoka, R. Kawase, M. Yuasa-Kawase, K. Nakatani, M. Inagaki, K. Tsubakio-Yamamoto, T.

- Ohama, A. Matsuyama, M. Nishida, M. Ishigami, I. Komuro, and S. Yamashita. 2010. Molecular mechanisms of ezetimibe-induced attenuation of postprandial hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb* 17: 914-924.
157. Karpe, F. 2002. Postprandial lipemia--effect of lipid-lowering drugs. *Atheroscler Suppl* 3: 41-46.
158. Ansquer, J. C., I. Bekaert, M. Guy, M. Hanefeld, and A. Simon. 2009. Efficacy and safety of coadministration of fenofibrate and ezetimibe compared with each as monotherapy in patients with type IIb dyslipidemia and features of the metabolic syndrome: a prospective, randomized, double-blind, three-parallel arm, multicenter, comparative study. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 9: 91-101.
159. Athyros, V. G., K. Tziomalos, A. Karagiannis, and D. P. Mikhailidis. 2011. Dyslipidaemia of obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: the case for residual risk reduction after statin treatment. *The open cardiovascular medicine journal* 5: 24-34.
160. Fabbrini, E., B. S. Mohammed, K. M. Korenblat, F. Magkos, J. McCrea, B. W. Patterson, and S. Klein. 2010. Effect of fenofibrate and niacin on intrahepatic triglyceride content, very low-density lipoprotein kinetics, and insulin action in obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2727-2735.
161. Guyton, J. R., S. Fazio, A. J. Adewale, E. Jensen, J. E. Tomassini, A. Shah, and A. M. Tershakovec. 2012. Effect of extended-release niacin on new-onset diabetes among hyperlipidemic patients treated with ezetimibe/simvastatin in a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 35: 857-860.

162. Walters, R. W., A. K. Shukla, J. J. Kovacs, J. D. Violin, S. M. DeWire, C. M. Lam, J. R. Chen, M. J. Muehlbauer, E. J. Whalen, and R. J. Lefkowitz. 2009. beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest* 119: 1312-1321.
163. Park, I. K., and Y. H. Koh. 2001. Effects of nicotinamide coenzymes on the stability of enzyme activities and proteins in niacin-deficient quail tissues against trypsin treatment. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 128: 99-107.
164. Bjorn, L., T. P. Leren, L. Ose, A. Hamsten, and F. Karpe. 2000. A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP -493G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20: 1784-1788.
165. Gaddi, A., A. F. Cicero, F. O. Odo, A. A. Poli, and R. Paoletti. 2007. Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vasc Health Risk Manag* 3: 877-886.

Annexe I : Formulaire de consentement

Formulaire de Consentement

Titre: Cibler l'hyperapob100 pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses; mécanisme d'action – Sous Étude

Commanditaires: Fonds de recherche des IRSC accordé au D^r May Faraj

Investigateur principal : May Faraj, Dt.P., Ph.D.

Collaborateurs: Médecin: Rémi Rabasa-Lhoret, M.D., Ph.D.
Robert Dufour, M.D., M.Sc.
Pierre Larochelle, M.D., Ph. D., FRCPC, FACP, FAHA
Assistante de recherche: Annie Tardif, B.Sc.

Vous êtes invité(e) à prendre part à une étude de recherche à l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). Avant de participer à ce projet complémentaire à l'étude principale, veuillez prendre le temps de lire et de comprendre les renseignements qui suivent. Le présent document peut contenir des termes que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugez utiles aux chercheurs et à leurs assistants.

Introduction et objectifs de l'étude

L'obésité n'est pas une maladie homogène : certains patients présentent des complications (diabète de type 2, élévation des lipides, etc.) alors que d'autres n'en présentent pas. Pour les lipides, il est bien établi que l'élévation du mauvais cholestérol (LDL-cholestérol) augmente le risque de maladie cardiaque. Néanmoins, il est possible qu'un marqueur de l'élévation du nombre de LDL (apo B) qui augmente le risque de maladie cardiaque peut aussi augmenter d'autres complications de l'obésité comme le diabète de type 2. Nous voulons étudier certaines implications d'une élévation de l'apoB chez des sujets ayant un LDL-cholestérol à un niveau ne justifiant pas d'intervention médicale.

Vous participez déjà à l'étude principale intitulée « Cibler l'hyperapob100 pour réduire le risque de diabète de type 2 chez les sujets obèses; mécanisme d'action – Étude Principale ». L'objectif principal de cette étude principale est d'étudier et de comparer la résistance à l'insuline et l'inflammation chez des sujets obèses ou ayant un surplus de poids et ayant un taux élevé ou normal d'apoB. Les objectifs additionnels de cette sous-étude sont de mesurer l'inefficacité d'entreposage des matières grasses dans le tissu adipeux (gras) chez des sous-groupes de la population étudiée dans l'étude principale.

Nature du protocole

Votre participation à cette sous-étude ajoute deux visites supplémentaires à l'IRCM (visite #6 et #18 dans le sommaire plus bas). Environ 32 sujets seront invités à participer à cette sous-étude. Si vous êtes éligible et que vous acceptez de participer, nous déterminerons votre utilisation et votre entreposage de la matière grasse d'un repas riche en lipides et marqué avec un isotope stable (un repas enrichi en ¹³C).

Pour ce test, vous devez être à jeun depuis 20h la veille (eau permise). Pour ce faire, on installera un cathéter flexible en téflon qui sera inséré dans une veine de l'avant bras. Pour faciliter les prises de sang, le bras servant aux prélèvements est placé dans une couverture chauffante. Nous débutons le test par une biopsie du tissu adipeux. Pour ce faire, le médecin en charge désinfectera d'abord votre peau et pratiquera une anesthésie locale sur un côté de votre hanche. Une fois l'anesthésie obtenue, le médecin prélèvera 4-5 grammes de graisse par aspiration à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. Après 45 min, nous mesurerons votre dépense énergétique au repos pendant 15 minutes par la calorimétrie indirecte. Ensuite, nous prendrons un échantillon de l'air que vous expirez (en soufflant dans un sac) et un prélèvement sanguin.

Par la suite, vous aurez 10 minutes pour prendre le repas enrichi en ^{13}C sous forme de croissant, fromage, bacon, brownies et café. À partir de ce moment et pendant les 6 heures suivantes, nous répéterons les collectes de votre sang et de votre air expiré ainsi que la mesure de votre dépense énergétique aux temps 1, 2, 4 et 6 heures. Finalement, une deuxième biopsie du tissu adipeux sera effectuée au temps 4 heures sur l'autre hanche.

Une quantité d'environ 250 ml de sang (une tasse) sera prélevée (en plus du 262 ml de sang prélevé la semaine avant). Aussi, une quantité d'environ 8-10 grammes du tissu adipeux sera prélevée pour cette partie de l'étude. Pendant le test, vous devrez demeurer couché, mais si vous le désirez, vous pourrez boire de l'eau. Nous vous offrons une collation avant de quitter notre unité.

Les échantillons de sang, d'air expiré et du tissu adipeux nous permettront de déterminer le contenu en ^{13}C de votre corps (niveau basal et après le repas enrichi en ^{13}C). Nous évaluerons aussi dans vos échantillons sanguins les niveaux de plusieurs marqueurs impliqués dans l'obésité. Finalement, la biopsie de tissu adipeux sera utilisée pour étudier l'expression génétique (ARN) et l'inflammation de votre tissu.

Résumé des visites au cours de l'étude

Les visites additionnelles mentionnées dans ce consentement sont les visites # 6 and # 18

Visite	Calendrier	Description de la visite à l'IRCM	Durée
A. Dépistage			
1	Temps 0	Examen médical. Formulaire de consentement. Prise de sang (24 mL) et mesure de poids, taille, tension artérielle Pour vérifier votre éligibilité	1h00
B. Stabilisation de poids (4 semaines)			
2	1 sem	Pesée (tension artérielle)* Examen médical et rencontre nutritionnelle	90 min
3	2 sem	Pesée (tension artérielle)* Remise du journal alimentaire 3 jours de départ rempli par le patient	10 min
4	3 sem	Pesée Tension artérielle et/ou prise de sang (5 mL) – Pour réévaluer votre éligibilité*	10 min
C. Composition corporelle, dépense énergétique au repos et sécrétion et sensibilité à l'insuline			
5	4 sem	Pesée, (tension artérielle)* Composition corporelle (DEXA scan, tour de taille et des hanches) Dépense énergétique (calorimétrie indirecte) Sécrétion et sensibilité à l'insuline (Botnia clamp) (262 mL)	6 heures

D. Entreposage et oxydation d'un repas riche en lipides et biopsies de tissu adipeux			
6	4 sem	Consommation d'un repas enrichi en ¹³ C, prise de sang (250 mL) et d'expiration, dépense énergétique, biopsies du tissu adipeux.	7h30
E. Perte de poids (24 semaines)			
7	5 sem	Pesée, (tension artérielle)* Intervention nutritionnelle pour perte de poids	1 heure
8	9 sem	Pesée, (tension artérielle)* suivi diététique	30 min
9	13 sem	Pesée, (tension artérielle)* Dépense énergétique (calorimétrie indirecte) Réajustement de l'intervention nutritionnelle	1 heure
10	17 sem	Pesée, (tension artérielle)* suivi diététique	30 min
11	21 sem	Pesée, (tension artérielle)* suivi diététique	30 min
12	25 sem	Pesée, (tension artérielle)* suivi diététique	30 min
13	29 sem	Pesée, (tension artérielle)* Remise du journal alimentaire 3 jours après perte de poids rempli par le patient Intervention nutritionnelle pour le maintien du poids	1 heure
F. Stabilisation du poids corporel post-intervention (4 semaines)			
14	30 sem	Pesée	10 min
15	31 sem	Pesée	10 min
16	32 sem	Pesée	10 min
G. Composition corporelle, dépense énergétique et sécrétion et sensibilité à l'insuline post-intervention			
17	33 sem	Pesée Composition corporelle (DEXA scan, tour de taille et des hanches) Dépense énergétique (calorimétrie indirecte) Sécrétion et sensibilité à l'insuline (Botnia clamp) (262 mL)	6 heures
H. Entreposage et oxydation d'un repas riche en lipides et biopsies de tissu adipeux			
18	34 sem	Consommation d'un repas enrichi en ¹³ C, prise de sang (250 mL) et d'expiration, dépense énergétique, biopsies du tissu adipeux.	7h30

*Seulement pour les sujets qui étaient sous un traitement qui a été cessé pour le temps de l'étude par le médecin avant l'inclusion

Risques et inconvénients

Votre participation à l'étude comporte quelques risques.

Risques

Biopsie

Lors de la biopsie vous pourrez ressentir un léger inconfort au début de la procédure, lors de l'anesthésie locale (piqûre). Les risques encourus lors de la biopsie sont :

- Hématome (bleu) si un capillaire est blessé lors de l'aspiration. Environ 60% des sujets vont présenter cette complication. La taille de l'hématome est très variable, allant d'un centimètre à

près de 10 cm. Cet hématome disparaît généralement en moins de 2 semaines. Le risque d'hématome nécessitant un acte médical complémentaire est minime.

- Infection de la peau (risque minime), qui pourrait nécessiter la prise d'antibiotique.
- Perte de souplesse de la peau au site de la biopsie. Cette complication survient chez moins de 20% des sujets et disparaît en 1 à 2 mois.
- Allergie au produit anesthésique (le même utilisé pour les soins dentaires). Nous vérifierons avec vous le risque d'allergie avant la procédure.

Au cours des années 2003-2009 le D^r Rémi Rabasa-Lhoret a réalisé plus de 250 biopsies et environ 60% des sujets ont présenté un hématome. Deux sujets ont dû être revus en raison de la taille de leur hématome et dans ces deux cas, une simple surveillance a permis de s'assurer de la guérison de l'hématome. Aucune autre complication n'a été observée.

Repas enrichi en ¹³C

Votre participation à ce test comporte peu de risque. La consommation d'un repas riche en lipides peut occasionner des nausées ou des maux d'estomac temporaires. La consommation de l'isotope stable ne comporte aucun risque. Un isotope stable n'est pas radioactif, il s'agit d'une variante naturelle d'un atome. Cette technique est la méthode étalon (de référence) pour étudier le métabolisme des nutriments chez l'humain. L'insertion de cathéter pour les prélèvements pourrait causer un léger inconfort. Des ecchymoses (bleus) ou plus rarement des étourdissements (malaise vagal) peuvent survenir.

Risques socioéconomiques

Un des risques associés au projet de recherche est lié à la divulgation des résultats ou de votre participation à des tiers et en particulier à des assureurs. En effet, les résultats vous concernant obtenus dans cette étude pourraient permettre de vous identifier comme une personne étant plus à risque de développer des maladies cardiovasculaire ou le diabète. Cela pourrait modifier vos conditions d'assurabilité (assurance-vie, invalidité ou santé) ou d'obtenir certains emplois.

Bénéfices

Nous espérons aussi que les résultats obtenus nous permettront de faire avancer l'état de nos connaissances dans le domaine de l'obésité et éventuellement d'en faire profiter la société, mais vous ne retirerez pas de bénéfice immédiat de votre participation à cette étude.

Critères d'exclusion

Vous avez consenti et vous avez rencontré tous les critères d'éligibilité de l'étude principale. Un critère d'exclusion supplémentaire s'ajoute pour participer à cette sous-étude : vous ne devez pas avoir subi l'ablation de la vésicule biliaire (cholécystectomie). L'absence de vésicule biliaire peut affecter l'absorption des gras alimentaires.

Clause de responsabilité

Si, par la suite de votre participation à cette étude, il survenait un incident attribuable aux interventions médicales requises, il n'y a pas d'autre type de compensation prévu que ce qui est normalement couvert par votre assurance-maladie. Le D^r Rabasa-Lhoret, le D^r Robert Dufour et le D^r Pierre Larochelle disposent des assurances requises à la fois pour la pratique médicale, les activités et les procédures de recherche. Cependant, en signant le présent formulaire vous ne renoncez à aucun des droits garantis par la loi.

Confidentialité

Les sujets participant à cette étude seront identifiés par un code numérique spécifique. En aucun moment votre nom ne sera divulgué. Lors de présentations de résultats à des réunions scientifiques ou lors de publications, vous serez identifié(e) uniquement par votre code numérique. Le décodage ne pourra être fait que par le chercheur principal ou par une personne déléguée par ce dernier.

Cependant, il est possible qu'un délégué du Comité d'éthique de l'Institut de recherches cliniques de Montréal consulte votre dossier de recherche incluant les données médicales, de même que votre formulaire de consentement, afin de s'assurer que l'étude est faite selon le protocole et qu'elle respecte les règles d'éthique. Avec votre consentement, nous pourrions transmettre les résultats des tests à votre médecin traitant.

Les échantillons de votre sang et d'ARN seront conservés à l'Institut de recherches cliniques de Montréal, sous la responsabilité de Drs May Faraj et Rémi Rabasa-Lhoret pour la durée d'analyse et de publication complète du projet de recherche (10 ans après la fin du projet). En aucun cas, ces échantillons ne peuvent être vendus à qui que ce soit (ex. industrie, chercheur)

Selon les normes en vigueur, les données doivent être conservées pour une durée de 10 ans pour fin de vérification. En cas de l'arrêt de l'étude, les échantillons seront détruits et les données déjà collectées conservées pour fin de vérification ultérieure (10 ans).

Liberté de participation et de retrait de l'étude

Votre participation à cette étude est tout à fait volontaire. Vous êtes donc libre d'accepter ou de refuser d'y participer et vous pouvez vous retirer de l'étude en tout temps, sur simple avis verbal, sans que cela n'affecte les traitements auxquels vous avez droit, ni ne nuise aux relations avec votre médecin. La chercheuse s'engage à vous faire connaître tout nouveau développement qui pourrait influencer votre décision de participer à l'étude. Vous pourrez également refuser de participer à cette sous-étude tout en continuant de participer à l'étude principale.

Indemnité

Vos frais de déplacement par transport en commun et de stationnement vous seront remboursés. Les tests effectués seront gratuits pour tous les participants.

Possibilités de commercialisation

L'analyse de votre échantillon pourrait contribuer à la création de produits commerciaux, par exemple des médicaments contre l'obésité ou le diabète. Par contre, même si par le biais de votre participation à cette étude vous contribuez à l'élaboration d'un produit, vous ne pourrez en retirer aucun bénéfice monétaire ou financier.

Personnes-ressources

Vous pouvez obtenir plus de renseignements concernant l'étude ou sur votre participation en communiquant avec :

- La D^{re} May Faraj au (514) 987-5655.
 - Le ^{Dr} Rémi Rabasa-Lhoret au (514) 987-5666, Le ^{Dr} Robert Dufour au (514) 987-5758 ou le Dr Pierre Larochelle au (514) 987-5549
- Vous pouvez obtenir de l'aide médicale 24 heures/24 en téléphonant au service de messages aux médecins du CHUM au (514) 890-8100. Le service des messages peut joindre le D^r Rabasa-Lhoret en tout temps. Le Dr Rabasa-Lhoret est aussi joignable par courriel : remi.rabasa-lhoret@ircm.qc.ca
- La coordonnatrice de l'étude: Annie Tardif au (514) 987-5500 poste # 3322 ou par courriel annie.tardif@ircm.qc.ca
 - La D^{re} Madeleine Roy, membre du Comité d'éthique, au (514) 987-5636 s'il a des questions en tant que sujet de recherche.

Consentement

Je déclare avoir pris connaissance du présent formulaire de consentement. Je reconnais que la nature et le déroulement du projet de recherche m'ont été expliqués, qu'on a répondu à toutes mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre une décision. Je comprends en quoi consiste ma participation à cette étude et j'accepte volontairement et librement d'y participer. En signant le présent formulaire, je ne renonce à aucun de mes droits légaux ni ne libère le chercheur, le médecin, l'hôpital ou le commanditaire de leur responsabilité civile et professionnelle.

Nom du participant	
Signature du participant	
Date	

Je consens à ce que les résultats de cette recherche, qui sont pertinents à mon suivi médical, soient transmis à mon médecin traitant.

Oui :

Non :

Déclaration du chercheur

J'ai expliqué la nature, le but, les procédures, les avantages et les risques de la présente étude. J'ai répondu à toutes les questions qui m'ont été posées. Je crois que le sujet comprend pleinement mes explications et que son consentement a été donné librement.

Nom du chercheur	D ^{re} May Faraj ou D ^r Rémi Rabasa-Lhoret ou D ^r Robert Dufour ou Dr Pierre Larochelle
Signature du chercheur	
Date	

Distribution du formulaire de consentement

- Remettre une copie originale au patient.
- Garder une copie originale au dossier de la clinique de l'IRCM.
- Garder une copie originale aux dossiers de la chercheuse.