Université de Montréal

Contribution de l'intestin dans le syndrome de résistance à l'insuline chez l'enfant

Par

Simona Stan

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctorae (PhD)

en Nutrition

Avril 2005

© Simona Stan, 2004

QU
145
U58
2005
v.005

Université de Montréal

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Contribution de l'intestin dans le syndrome de résistance à l'insuline chez l'enfant

présentée par :

Simona Stan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dominique Garrel
Président-rapporteur

Dr Emile Levy
Directeur de recherche

Dr Marie Lambert
Codirectrice

Dr Victor Gavino
Membre du jury

Dr Julie Lafond
Examinatrice externe

Dr Monique Gonthier
Représentante du doyen de la FES

SOMMAIRE

Il est très bien établi aujourd'hui que l'obésité infantile a atteint des proportions alarmantes au Canada et à l'échelle mondiale. Cette forme d'obésité constitue un risque accru de diabète de type 2, d'hyperlipidémie et d'athérosclérose. De plus, elle est étroitement reliée à la résistance à l'insuline et se situe au centre du syndrome de résistance à l'insuline (SRI), défini comme le regroupement de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension, une dyslipidémie caractéristique, l'obésité, l'intolérance au glucose, l'hyperinsulinémie, ainsi que des anomalies de la fibrinolyse et de la coagulation. De nombreuses études ont documenté la présence simultanée de ces facteurs de risque chez l'adulte, mais très peu visent les populations pédiatriques. Dans ce contexte, ce projet vise spécifiquement l'étude de la contribution de l'intestin dans le SRI chez l'enfant, plus précisément à travers le métabolisme lipidique. La population étudiée est composée de trois groupes d'enfants et adolescents québécois, âgés de 9, 13 et 16 ans respectivement, pour un total de 2249 sujets. Parmi les instruments utilisés lors de la collecte des données on retrouve des questionnaires, des mesures anthropométriques telles que le poids, la taille et les plis cutanés, la mesure de la tension artérielle et des prélèvements sanguins. Les résultats sanguins suivants étaient disponibles: l'insuline, la glycémie et un bilan lipidique complet. Du plasma résiduel et des échantillons d'ADN étaient disponibles pour des études complémentaires. Nous avons déterminé un facteur de risque cardiovasculaire important pour une évaluation précise du risque athérosclérotique: la taille des particules LDL.

Ayant cet objectif en vue, une partie de cette étude porte sur le rôle des polymorphismes Ala54Thr du gène FABP2 et –493 G/T du gène MTP dans la pathogenèse du SRI. Un parallèle a été fait entre des recherches épidémiologiques et fondamentales effectuées sur des explants intestinaux humains. Cette étude a permis de démontrer, chez les jeunes présentant un SRI, une variabilité dans l'expression de la dyslipidémie (↑ cholestérol total, ↑LDL-C, ↑apo B) selon le génotype du I-FABP, effet modulé par la triglycéridémie. Une augmentation de la sécrétion de lipides en présence de l'allèle Thr du gène FABP2 a été observée *in-vitro*, mais aucun impact du génotype du MTP n'a été noté. Préalablement, nous avons procédé à la caractérisation du MTP, en examinant son profil ontogénique et sa distribution intracellullaire. En ce qui concerne la taille des particules LDL, notre étude a permis d'en décrire la distribution, donnée jusqu'à ce jour très peu connue dans la population pédiatrique, d'identifier les paramètres pouvant moduler cette variable et de la mettre en relation avec le SRI. Un autre facteur ayant retenu notre attention est la leptine. L'étude de l'effet de cette hormone adipocytaire sur le métabolisme des lipides dans les cellules Caco-2 a apporté un éclairage nouveau sur son implication dans la contribution de l'intestin à l'hyperlipidémie post-prandiale, à savoir une réduction du transport intestinal des lipides. Cette étude est unique en soi, puisque la diversité des éléments recueillis au sein de cette population pédiatrique conduira vers une caractérisation complète du SRI, ce qui permettra d'envisager des critères d'évaluation ou de diagnostic et des

avenues thérapeutiques en mesure de prévenir les complications potentielles.

Mots clés : syndrome de résistance à l'insuline, obésité, enfants, adolescents, intestin, lipides, fatty acid binding protein, microsomal triglyceride transfer protein, taille des particules LDL, leptine.

ABSTRACT

It is very well established that obesity in youth reached alarming proportions in Canada and worldwide. This form of obesity represents a great risk for type 2 diabetes, hyperlipidemia and atherosclerosis. Furthermore, il is closely associated to insulin resistance and can be found in the center of insulin resistance syndrome (IRS), defined as a cluster of several cardiovascular risk factors such as hypertension, dyslipidemia, obesity, glucose intolerance, hyperinsulinemia as well as fibrinolysis and coagulation abnormalities. Numerous studies showed the simultaneous presence of these risk factors in adults, but very little data emerged from pediatric populations. In this context, this project aims specifically to study the contribution of the intestine in IRS in youth, more exactly through lipid metabolism. The studied population consists of three groups of Quebec children and adolescents, aged 9, 13 and 16 years respectively, for a total of 2249 participants. Among instruments used during data collection, there were questionnaires, anthropometric measures such as weight, height and skinfolds, blood pressure and blood samples. Fasting plasma insulin, glyceamia and a complete lipid profile were available. Residual plasma and DNA were also available for complementary measurements. We determined an important cardiovascular risk factor for the precise evaluation of the atherosclerotic risk: LDL particle size. Considering this objective, a part of our study consists in analyzing the role of FABP2 Ala54Thr and MTP –493G/T gene polymorphisms in IRS pathogenesis and a parallel was made between epidemiological and fundamental studies performed in human intestinal

explants. This study allowed to demonstrate, in youth presenting IRS, a variability in the dyslipidemia expression (↑ total cholesterol, ↑LDL-C, ↑apo B) according to I-FABP genotype, an effect modulated by triglyceridemia. An increase of lipid secretion in the presence of the FABP2 Thr allele was observed *in-vitro*, while no impact of the MTP genotype was recorded. We previously proceeded to the characterization of the MTP, by examining its ontogenetic profile and its intracellular distribution. This study also described the LDL particle size distribution, since little information is available in pediatric population and allowed the identification of several biochemical variables associated with LDL particle size. Another factor having held our attention is leptin. The study of the effect of this adipocyte hormone on lipid metabolism in Caco-2 cells brought new lighting as to its implication in the intestinal contribution to post-prandial hyperlipidemia, namely a reduction in lipid transport. This study is unique, because the variety of elements available in this pediatric population lead towards a complete characterization of IRS, which will allow to establish evaluation or diagnostic criterias as well as therapeutic measures to prevent potential complications.

Key words: insulin resistance syndrome, obesity, children, adolescents, intestine, lipids, fatty acid binding protein, microsomal triglyceride transfer protein, LDL particle size, leptin.

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....i

Page d'identification du jury.....ii

Sommaire.....iii

Abstract.....vi

Table des matières.....viii

Liste des tableaux.....xi

Liste des figures.....xii

Liste des abréviations.....xiii

Dédicace.....xvi

Remerciements.....xvii

INTRODUCTION.....1

1. Obésité.....2

1.1 Définition.....3

1.2 Obésité abdominale.....6

1.3 Causes de l'obésité.....8

1.4 Complications associées à l'obésité.....13

2. Résistance à l'insuline.....15

2.1 Définition.....15

2.2 Déterminants de la sensibilité à l'insuline.....16

2.3 Méthodes d'évaluation de la résistance à l'insuline.....22

3. Syndrome de résistance à l'insuline.....25

4. Métabolisme lipidique.....32

4.1 Métabolisme intestinal des lipides.....32

4.2 Métabolisme des lipoprotéines.....34

4.2.1 Chylomicrons.....36

4.2.2 Very Low Density Lipoproteins (VLDL).....38

4.2.3 Intermediate Low Density Lipoproteins (IDL).....39

4.2.4 High Density Lipoproteins (HDL).....39

5. Rôle des acides gras dans la résistance à l'insuline.....42

5.1Muscle.....43

5.2Foie.....44

5.3Tissu adipeux.....46

5.4Hyperlipidémie post-prandiale et résistance à l'insuline...47

5.5Action des acides gras libres sur la sécrétion d'insuline...52

5.6Action des acides gras sur la cellule β-pancréatique-anomalies fonctionnelles.....58

5.7Effets des différents types d'acides gras sur la sensibilité à l'insuline.....65

5.8 Rôle de l'adipocyte dans la résistance à l'insuline.....73

6. *Fatty acid binding protein (FABP)*.....86

7. *Microsomal triglyceride transfer protein (MTP)*.....90

8. Taille des particules LDL.....95

9. Rôle de la leptine dans le tractus gastro-intestinal.....110

10. Description de la population et objectifs généraux.....119

11. Objectifs spécifiques.....124

ARTICLES

1er article : The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants.....129

2ème article: Immunolocalization, ontogeny and regulation of microsomal triglyceride transfer protein in human fetal intestine.....162

3ème article: Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: Possible role in the assembly of chylomicrons.....197

4ème article: Intestinal fatty acid binding protein and microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms in French-Canadian youth.....243

5ème article: Distribution of LDL particle size in a population-based sample of children and adolescents and relation with other cardiovascular risk factors.....280

6ème article: Effect of human recombinant leptin on lipid handling by fully differentiated Caco-2 cells.....318

12. DISCUSSION.....342

13. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....372

14. ANNEXE : Rapport sur le contrôle de la qualité des valeurs de la taille des particules LDL.....xix

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Critères de classification du surpoids et de l'obésité établis par l'OMS.....4

Tableau II : Risque pour la santé à partir de la valeur du tour de taille.....8

Tableau III : Syndrome de résistance à l'insuline : définitions proposées.....28

Tableau IV : Caractérisation des différentes classes de lipoprotéines.....36

Tableau V : Enzymes ou autres éléments modulés par les acides gras polyinsaturés (ω-3 et ω-6).....68

Tableau VI : Effets des différentes classes d'acides gras sur la sensibilité à l'insuline.....72

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Métabolisme des lipoprotéines.....41

Figure 2 : Voies de formation des Acyl CoA à longue chaîne.....56

Figure 3 : Mécanismes reliant le TNF-α à la résistance à l'insuline.....76

Figure 4 : Mécanisme de formation des particules de LDL petites et denses.....104

Figure 5 : Actions de la leptine.....112

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	:	Adénine
Å	:	Argstrom
ABC A-I	:	Adénosine triphosphate (ATP) – binding cassette-1
ACC	:	Acétyl CoA carboxylase
AcCoA	:	Acétyl Coenzyme A
ACS	:	Acyl CoA synthétase
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADP	:	Adénosine diphosphate
ADSF	:	Adipose tissue specific factor/Facteur sécrété spéciquement par le tissu adipeux
AER	:	Albumin excretion rate/Taux d'excrétion de l'albumine
AGL	:	Acides gras libres
AGMI	:	Acides gras monoinsaturés
AGPI	:	Acides gras polyinsaturés
AGRP	:	Agouti related protein/Protéine agouti
AGS	:	Acides gras saturés
Ala	:	Alanine
ALC	:	Acide linoléique conjugué
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
ApMI	:	Acrp30, adipoQ, gelatin-binding protein-28 - Synonymes d'adiponectine
Apo	:	Apolipoprotéine
Arg	:	Arginine

ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ATP	:	Adénosine triphosphate
CART	:	Cocaine and Amphetamine Regulating Transcript/Transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine
CCK	:	Cholécystokinine
CDC	:	Centres for Disease Control and Prevention/Centres pour le contrôle et la prévention des maladies
CETP	:	Cholesterol ester transfer protein/Protéine de transfert du cholestérol ester
CIGMA	:	Continuous Infusion of Glucose with Model Assessment/ Infusion continue de glucose avec modélisation mathématique
CPT-1	:	Carnitine palmitoyltransférase-1
CRP	:	C-Reactive protein/Protéine C-réactive
Cu	:	Cuivre
Db/db	:	Modèle animal déficient en récepteur de la leptine
EGF	:	Epidermal growth factor/Facteur de croissance épidermique
EGIR	:	European Group for the Study of Insulin Resistance/Groupe européen pour l'étude de l'insulino-résistance
ESSEA	:	Enquête sociale et de santé auprès des enfants et adolescents québécois
F	:	Femme
Fa/fa	:	Rat Zucker obèse et spontanément diabétique
FABP	:	Fatty acid binding protein/Protéine transporteuse des acides gras

FABP2 : Gène codant pour la I-FABP

FABPpm : Plasma membrane fatty acid binding protein/Protéine transporteuse des acides gras de la membrane plasmatique

FAS : Fatty acid synthase/Acide gras synthase

FAT/CD36: Fatty acid translocase/Acide gras translocase

FATP4 : Fatty acid transporter protein 4/Protéine de transport des acides gras 4

FIZZ : Found in inflammatory zone/Trouvée dans une zone inflammatoire

G : Guanine

G-6DH : Glucose-6-Déshydrogénase

GLUT-4 : Glucose transporter-4/Transporteur de glucose de type 4

H : Homme

HDL : High Density Lipoprotein/Lipoprotéine de haute densité

HDL_2 : Large High Density Lipoprotein/Lipoprotéine de haute densité de grande taille

HDL_3 : Small High Density Lipoprotein/Lipoprotéine de haute densité de petite taille

HDL-C : High Density Lipoprotein – Cholesterol/Cholestérol associé à la lipoprotéine de haute densité

HMG-CoA réductase : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase

HOMA : Homeostasis Model Assessment/Modèle d'évaluation d'homéostasie

ICAM-1	:	Intercellular adhesion molecule-1/Molécule d'adhésion intercellulaire-1
IDL	:	Intermediary density lipoprotein/Lipoprotéine de densité intermédiaire
I-FABP	:	Intestinal fatty acid binding protein/ Protéine transporteuse des acides gras intestinale
IFN-γ	:	Interféron γ
IGF-1	:	Insulin-like growth factor-1/Facteur de croissance analogue à l'insuline-1
IkB	:	Inhibitor of NF kappa B/Inhibiteur de NF kappa B
IKK	:	IkB kinase
IL-6	:	Interleukine-6
IMC	:	Indice de masse corporelle
iNOS	:	Nitric Oxyde synthase inductible/Oxyde nitrique synthase inductible
IOTF	:	International Obesity Task Force/Comité international sur l'étude de l'obésité
IRS-1	:	Insulin receptor substrate-1/Substrat 1 du récepteur de l'insuline
JAK/STAT:		Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription - Janus kinase/Transducteurs du signal et activateurs de la transcription
JNK	:	c-Jun N-terminal kinase
KKA^y	:	Modèle murin souffrant d'un diabète d'origine polygénique

LCAT : Lecithin-cholestérol acyl-transférase

LC-CoA : Acyl-coenzyme A à longue chaîne

LDL : Low Density Lipoprotein/Lipoprotéine de basse densité

LDL-C : Low Density Lipoprotein-Cholesterol/Cholestérol associé à la lipoprotéine de basse densité

L-FABP : Liver fatty acid binding protein/Protéine transporteuse des acides gras hépatique

LH : Lipase hépatique

LPL : Lipoprotéine lipase

LRP : LDL-receptor related protein/Protéine liée au récepteur LDL

MAP : Mitogen activated protein/Protéine activée par les mitogènes

MAPKs p-38 : MAP kinase p-38

MTP : Microsomal triglyceride transfer protein/Protéine de transfert des triglycérides microsomiale

NADH : Nicotinamide-adénine dinucléotide réduit

NCEP-ATP-III : National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel-III/Programme national d'éducation sur le cholestérol-Panel-III sur le traitement chez l'adulte

NFκB : Nuclear factor κB/Facteur nucléaire κB

NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey/Enquête nationale sur la santé et l'analyse nutritionnelle

NMR : Résonance magnétique nucléaire

NOS : Nitric oxyde synthase/Oxyde nitrique synthase

OAA : Oxaloacétate

Ob/ob	:	Modèle animal déficient en leptine
Ob-R	:	Récepteur à la leptine
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
ON	:	Oxyde nitrique
PAI-1	:	Plasminogen activator inhibitor-1/Inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène
PDI	:	Protein disulfide isomerase/Protéine disulfide isomérase
PepT1	:	Peptide uptake transporter T1/Transporteur de peptide T1
PKC	:	Protéine kinase C
PL	:	Phospholipides
POMC	:	Pro-opio-mélanocortine
PPAR	:	Peroxysome proliferator activated receptor/Récepteurs activés par les prolifératéurs des péroxysomes
QUICKI	:	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index/Index quantitatif de sensibilité à l'insuline
R-CM	:	Résidu de chylomicron
RE	:	Réticulum endoplasmique
RELM	:	Resistine –like molecule/Molécule analogue à la résistine
SAPK	:	Stress-activated protein kinase/Protéine-kinase activée par le stress
SOCS-3	:	Suppresseur de la signalisation des cytokines-3
SR-B1	:	Scavenger receptor-B1/Récepteur scavenger B-1
SREBP	:	Sterol response element binding protein/Protéine de liaison à l'élément de réponse aux stérols

SSPG	:	Steady state plasma glucose/Test de suppression insulinique
TG	:	Triglycéride
TGF-α	:	Transforming growth factor-α/Facteur de croissance transformant-α
T/H	:	Tour de taille/Tour de hanche
Thr	:	Thréonine
TNF-α	:	Tumor necrosis factor-α/Facteur de nécrose tumorale-α
TRH	:	Thyrotropin releasing hormone/Hormone libérant la thyrotropine
Trp	:	Tryptophane
Tub/tub	:	Modèle animal porteur d'une mutation dans le gène TUB
TZD	:	Thiazolidinédiones
VCAM-1	:	Vascular-cell adhesion molecule-1/ Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1
VGF	:	Nerve growth factor/Facteur de croissance endothélial
VLDL	:	Very low density lipoprotein/Lipoprotéine de très basse densité
Zn	:	Zinc

Je dédie cette thèse à …

… Mon mari, qui, par son amour, sa compréhension et sa patience a su me montrer la voie vers la réussite

…Mes parents, ma petite sœur et ma grand-mère en guise de reconnaissance pour leur appui constant et leur confiance tout au long de ces années de recherche.

Mais avant tout, à mon petit ange Rafael.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Emile Levy pour sa précieuse collaboration, son enseignement et ses conseils au fil de ces années de recherche. Par ailleurs, je tiens à souligner l'inestimable contribution de Dr Marie Lambert, ma co-directrice, dont le dévouement et la compétence m'ont été absolument indispensables tout au long de ce parcours.

Puisqu'il s'agit d'un projet de grande envergure, l'apport des collaborateurs a été déterminant. Ainsi, je voudrais mentionner la collaboration du Dr Benoit Lamarche qui a été décisive à la réalisation de l'étude concernant la taille des particules LDL et qui s'est manifestée par de précieux conseils techniques et par le don des standards utilisés lors de l'analyse. Je désire également remercier Dr. Moise Bendayan pour avoir partagé avec nous son expertise en immunocytochimie et Dr Daniel Ménard pour sa fidèle coopération ayant permis l'obtention des explants intestinaux.

Je voudrais également remercier chaleureusement Ginette Lagacé et Carole Garofalo pour leurs précieux conseils techniques et ma chère Zola, pour son expertise et son incomparable gentillesse.

Assurément, la réalisation de ce projet n'aurait pas été possible sans la collaboration de l'équipe de la Direction Santé Québec de l'Institut de la

Statistique du Québec. De manière plus précise, je tiens à mentionner l'inestimable expertise de Mme Claudette Lavallée, dont l'enseignement, l'encadrement, le savoir et la patience m'ont permis la rédaction de plusieurs parties des deux rapports issus de cette vaste enquête et d'acquérir une riche expérience en matière d'enquêtes nutritionnelles.

INTRODUCTION

1) Obésité

L'obésité a dernièrement pris des proportions épidémiques alarmantes devenant ainsi un des problèmes prioritaires de santé publique affectant autant les pays industrialisés que ceux en voie de développement. Il s'agit en réalité du désordre nutritionnel le plus fréquent et le plus coûteux dans les pays industrialisés. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a exprimé ses inquiétudes à l'égard de cette pathologie qui, longtemps considérée comme une préoccupation surtout d'ordre esthétique, occupe présentement une place importante dans le domaine médical (1). À ce sujet, l'OMS a estimé qu'en 1995, plus de 200 millions d'adultes à travers le monde étaient obèses et 18 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans présentaient un surplus de poids. Les prévisions n'en sont pas moins inquiétantes puisqu'on prévoit que le nombre d'adultes obèses atteindra 300 millions en 2025 (2).

Aux États-Unis, la série d'enquêtes nationales débutant en 1960, National Health Examination Survey (NHANES) a permis de dresser un portrait représentatif de l'évolution de l'obésité chez les adultes et les jeunes. Ainsi, entre 1963 et 1994, le pourcentage d'adultes obèses ou ayant un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m^3 est passé de 12 à 22.9 % et celui d'enfants obèses ($\geq 95^{ème}$ percentile pour l'IMC) de 4 à 14% (3, 4). Lors de la dernière partie de cette enquête prenant fin en 2000, la prévalence de l'obésité atteignait 30.5% chez les adultes (5) et plus de 15% chez les enfants et adolescents (6). Au Canada, entre 1970 et 1992, la prévalence de l'obésité chez les adultes est passée de 10 à 14% (7), ayant les Amérindiens comme

le groupe pédiatrique le plus à risque. Au sein de cette communauté, la prévalence de l'obésité est estimée à 30% (8) comparativement à 12.5% chez les enfants dans le reste du Canada (9). Les données européennes reconnaissent également l'obésité comme un problème majeur de santé publique (10). Il est à préciser que l'évolution de la prévalence de l'embonpoint, représenté par un IMC entre 25.0 et 29.9 chez l'adulte et entre les 85ème et 95ème percentiles chez les enfants, est parallèle à celle de l'obésité, ce qui signifie que d'une part, plus d'enfants prennent du poids et d'autre part, leur poids corporel devient de plus en plus considérable.

Conséquemment, les coûts directs reliés à l'obésité représentent aux États-Unis près de 7% et en Europe entre 1 et 5% des coûts totaux destinés à la santé (11). Au Canada, en 1997, ces coûts directs ont été estimés à plus de 1.8 milliards de dollars, ce qui correspond à 4.6 % du total des dépenses des soins de santé consacrées à l'ensemble des maladies (12). Finalement, aux États-Unis, on estime à 300 000 le nombre de décès annuels attribués à l'obésité (13).

1.1 Définition

Chez l'adulte, la définition du surpoids et de l'obésité est bien établie. En effet, l'OMS s'est basée sur le risque accru de mortalité, mais également sur celui de morbidité relié à un surplus de poids pour définir les catégories correspondant aux IMC présentées dans le tableau I (14).

Tableau I : Critères de classification du surpoids et de l'obésité établis par l'OMS.

Classification	IMC (kg/m^2)
Poids insuffisant	< 18.5
Normal	18.5 à 24.9
Surpoids	≥ 25.0
Pré-obésité	25.0 à 29.9
Obésité	≥ 30.0
- Classe I	30.0 à 34.9
- Classe II	35.0 à 39.9
- Classe III	≥ 40.0

Adapté de l'OMS, 1999 (15)

Toutefois, chez les jeunes, la définition de l'obésité est beaucoup moins standardisée que chez l'adulte. Tout d'abord, la distribution des valeurs d'IMC varie considérablement en fonction de l'âge et du sexe, ce qui engendre la nécessité d'utiliser des valeurs de références spécifiques à ces dernières variables. Pendant plusieurs années, la définition du surpoids et de l'obésité chez les jeunes était basée sur des valeurs de références provenant des données recueillies au sein de la première partie de l'étude NHANES

(1971-1974). En absence d'autres références internationales, ces recommandations ont été également émises par l'OMS depuis 1995 pour des jeunes âgés de 6-19 ans. Selon ces références, des valeurs d'IMC se situant entre les limites des 85ème et 95ème percentiles spécifiques pour l'âge et le sexe correspondent au surpoids. Quant à l'obésité, elle est définie par des valeurs d'IMC supérieures ou égales au 95ème percentile (16). Par la suite, deux autres suggestions ont été proposées.

La première, émise par les Centres for Disease Control and Prevention (CDC), est basée sur les courbes de croissance et est destinée aux enfants et aux adolescents américains (17). La deuxième a été proposée par l'International Obesity Task Force (IOTF), et ce, devant la difficulté d'estimer la prévalence de l'obésité à l'échelle internationale due à l'utilisation de différentes classifications (18). Ces dernières références reposent sur des données provenant de six pays et mettent en évidence des valeurs-seuils basées sur les courbes de percentiles passant par des valeurs d'IMC à 18 ans égales à 25 et à 30 kg/m^2 pour définir l'embonpoint et l'obésité, respectivement (19). Ces nouveaux standards permettent une estimation similaire à celle obtenue avec d'autres références (20, 21) et tout comme chez l'adulte, sont reliés aux risques de développer des problèmes de santé (19). De plus, leur application permettra des comparaisons à l'échelle internationale et une surveillance précise de cette épidémie qu'est l'obésité. Il est donc à souhaiter que cette nouvelle classification de l'embonpoint et l'obésité chez les jeunes soit adoptée par les cliniciens et les chercheurs à travers le monde.

1.2 Obésité abdominale

Malgré son utilisation courante en pratique clinique, l'IMC n'est pas en mesure de fournir des renseignements sur la composition de la masse corporelle ou sur la distribution de l'adiposité. Cependant, pour une même valeur d'IMC, l'accumulation de graisse au niveau abdominal est associée à un risque vasculaire et métabolique élevé. En effet, au-delà d'une adiposité généralisée, on reconnaît l'importance de la localisation du tissu adipeux, qui peut avoir un impact supplémentaire sur la résistance à l'insuline ou les autres complications de l'obésité. L'obésité androïde, caractérisée par l'accumulation de graisse viscérale a été davantage associée au diabète de type 2 que l'obésité gynoïde, où l'excès de tissu adipeux est situé dans la partie inférieure du corps. Les adipocytes viscéraux possèdent deux caractéristiques spécifiques qui les distinguent des autres types d'adipocytes : une sensibilité accrue aux stimuli lipolytiques et une réponse diminuée à l'action antilipolytique de l'insuline dans des conditions physiologiques. Ces deux derniers mécanismes convergent vers la libération excessive d'acides gras libres connue pour sa capacité d'altérer la sensibilité à l'insuline (22).

Cependant, malgré l'abondance de données reliant l'obésité viscérale et les troubles métaboliques chez les adultes ou les adolescents (23, 24, 25), les preuves d'une influence de la graisse abdominale indépendante de celle de l'adiposité totale lors de la période pré-pubertaire sont quasi inexistantes

(26, 27, 28). Toutefois, les données disponibles reflètent une relation entre l'obésité abdominale et la résistance à l'insuline ou un profil lipidique altéré chez les enfants, ce qui suggère que les facteurs de risque cardiovasculaire trouvent leur origine très tôt dans l'enfance (29).

Chez l'adulte, la mesure du tour de taille et le rapport tour de taille/tour de hanche sont les indicateurs les plus simples et les plus révélateurs de la distribution du tissu adipeux (25). Le tableau II résume la classification de l'OMS quant aux valeurs du tour de taille chez l'adulte et le risque de comorbidité correspondant; le niveau 1 correspondant à la présence éventuelle de facteurs de risque et le niveau 2, à la présence d'un risque substantiellement élevé requérant une intervention thérapeutique (14).

Les consignes concernant le rapport tour de taille/tour de hanche sont apparues comme une annexe aux recommandations nutritionnelles américaines de 1990. Initialement, on stipulait que ce rapport ne devait pas dépasser 0.95 chez l'homme et 0.80 chez la femme, et en 1995, on ajouta la notion de risque très élevé lorsque ce rapport dépassait 1.0 (10).

Tableau II : Risque pour la santé à partir de la valeur du tour de taille

Risque de comorbidité	Tour de taille	
	Homme	Femme
Niveau 1	≥ 94 cm	≥80 cm
Niveau 2	≥ 102 cm	≥88 cm

Adapté de l'OMS, 1999 (15)

Cependant, chez l'enfant, ces indices couramment utilisés chez l'adulte ne présentent pas la même puissante corrélation avec les données obtenues par imagerie. En pédiatrie, on favorise plutôt l'utilisation de la mesure des plis cutanés au niveau du tronc combinée à une mesure du tour de taille pour estimer la quantité de tissu adipeux intra-abdominal (29)

1.3 Causes de l'obésité

Étant donné la gravité de ce fléau qu'est l'obésité infantile, il est essentiel de connaître les raisons de sa rapide progression. En réalité, l'obésité est le résultat d'une étroite interaction entre plusieurs facteurs génétiques, environnementaux et psychologiques. Contrairement à la constance qui caractérise le profil génétique, les changements environnementaux et comportementaux sont en mesure d'expliquer en

grande partie cette hausse spectaculaire de la prévalence de l'obésité, autant chez l'adulte que chez l'enfant.

Des études effectuées sur des jumeaux identiques ont permis d'établir que la contribution des facteurs génétiques à l'adiposité corporelle est de 50 à 80% (30). Cette contribution se traduit principalement de trois manières : des syndromes génétiques souvent accompagnés par l'obésité, des formes monogéniques d'obésité et des gènes de susceptibilité.

Il est maintenant bien connu que l'obésité est un trait qui accompagne plus de 25 syndromes génétiques, comme Prader-Willi, Cohen, Alström et Bardet-Biedl, quoique les gènes spécifiques responsables ne soient pas entièrement identifiés (31, 32). Parmi les formes monogéniques d'obésité, on retrouve celles causées par les mutations du gène de la leptine, du récepteur de la leptine (33), de certains éléments de la voie des mélanocortines, comme le pro-opio-mélanocortine (POMC) et le récepteur aux mélanocortines de type 4, ainsi que de la prohormone convertase 1 (31, 32, 34, 35).

Par contre, les situations où un seul gène est identifié comme étant majoritairement responsable de l'obésité sont extrêmement rares. Les formes les plus communes d'obésité sont associées à des gènes impliqués dans plusieurs étapes du métabolisme, depuis l'absorption des nutriments jusqu'à la dépense énergétique (31). En ce sens, plusieurs gènes candidats ont été identifiés et leur nombre ne cesse de croître. En 2003, plus de 90 gènes candidats associés aux phénotypes reliés à l'obésité humaine étaient répertoriés grâce à plusiuers études d'association et de linkage, parmi lesquels on retrouve les gènes codant pour le récepteur β-adrénergique,

l'agouti related protein (AGRP) et l'interleukine 6 (IL-6) (36, 587). Cette susceptibilité génétique est à la base d'une tendance à développer l'obésité qui est généralement dévoilée dans un environnement propice ou obésogénique (37).

Parmi les causes endogènes de l'obésité, on retrouve également plusieurs sources de nature hormonale, telles que l'hypothyroïdie ou la maladie de Cushing, mais également de nature neuroendocrinienne comme la présence d'une tumeur ou d'une lésion vasculaire hypothalamique (38).

Il ne faut pas perdre de vue que l'obésité est aussi la conséquence du maintien à long terme d'un équilibre énergétique positif où l'apport alimentaire dépasse l'énergie requise aux besoins métaboliques de base, la croissance, l'activité physique et la thermorégulation (32). Pour cette raison, l'activité physique et l'apport énergétique sont deux facteurs environnementaux essentiels, susceptibles d'influencer l'apparition ou la progression de l'obésité. Ainsi, le degré élevé de sédentarité qui caractérise la société actuelle pourrait expliquer, en grande partie, cette hausse spectaculaire de la prévalence de l'obésité, autant chez l'adulte que chez l'enfant (37, 39). D'autre part, le rôle d'une diète hypercalorique, notamment riche en matières grasses dans le développement de l'obésité, est un concept désormais bien accepté qui a été mis en évidence par des données expérimentales et épidémiologiques. L'action des matières grasses alimentaires est en partie exercée par leur faible capacité d'induire la satiété et par leur forte densité calorique. Finalement, l'association entre l'apport et l'oxydation lipidiques est

compromise chez les sujets obèses, ce qui favorise davantage l'entreposage lipidique dans le tissu adipeux (39, 40, 41).

Des données récentes suggèrent également l'influence de plusieurs facteurs périnataux ou pédiatriques affichant un potentiel de développer l'obésité à l'âge adulte. Parmi ces derniers, on peut citer le retard de croissance intra-utérine, l'allaitement maternel et le rebond d'adiposité ou d'IMC. L'étroite association entre un risque élevé d'obésité et un retard de croissance intra-utérine a été mise en évidence par plusieurs études animales et humaines (42, 43). Elle repose sur l'hypothèse des origines fœtales qui introduit le concept de reprogrammation. Ce concept stipule que cette manifestation métabolique provient d'un processus d'adaptation auquel se conforme le fœtus lorsqu'il est exposé à une malnutrition *in utero*. Ainsi, le fœtus répond à un apport nutritionnel limité de plusieurs manières : en redistribuant le flux cardiaque en vue de protéger les organes-clé comme le cerveau, en modifiant le métabolisme de manière à réorienter l'oxydation du glucose vers les acides aminés, en changeant la sensibilité des tissus vis-à-vis de certaines hormones impliquées dans la croissance dont l'insuline et en ralentissant sa croissance corporelle, puisque cet ajustement limite les besoins en substrats énergétiques. Ce remodelage des voies endocriniennes conduit à des changements métaboliques permanents, incluant la résistance à l'insuline, permettant de favoriser la survie et le développement des organes vitaux au détriment de la croissance (44-47).

Même si le poids et la taille corporels demeurent plus réduits chez un enfant de petit poids à la naissance en présence d'une diète équilibrée, un

excès calorique conduit à un rattrapage du poids corporel après la puberté et à une croissance rapide. Cette croissance peut être associée à des anomalies métaboliques plus tard dans la vie, telles que l'obésité, la résistance à l'insuline et aux maladies coronariennes (45, 48). Il est très probable que ce phénomène soit dû à une masse musculaire initialement réduite et à une accumulation ultérieure de tissu adipeux (44), ainsi qu'à l'hyperphagie post-natale souvent rencontrée chez les enfants de petit poids à la naissance (43, 49).

Outre les propriétés immunitaires et nutritionnelles, les vertus d'un allaitement maternel soutenu s'orientent également vers la prévention du développement de l'obésité. Mis à part une teneur calorique et protéique moindres, le lait maternel contient des facteurs bioactifs en mesure de moduler les niveaux du facteur de croissance épidermique (EGF) et du facteur de croissance tumorale-α (TNF-α) et est associé à une insulinémie plus basse des nourrissons, et ce, en comparaison avec les formules lactées. Ces particularités inhibent la différenciation et le développement adipocytaires et préviennent ainsi l'accumulation d'un surplus de tissu adipeux (50, 51).

Après une augmentation initiale, l'IMC diminue pour atteindre son minimum vers 4-6 ans avant de commencer son ascension finale vers le poids de l'âge adulte. Cette dernière montée est appelée rebond d'adiposité et plusieurs études ont démontré que les enfants manifestant cette adiposité minimale à un âge précoce, soit avant l'âge de 5,5 ans, voient leurs chances de devenir obèses à l'âge adulte augmentées (52). Il a été, par ailleurs,

suggéré que ce rebond d'adiposité pouvait refléter une exposition à un diabète gestationnel, représenter un marqueur d'une croissance accélérée ou offrir une plus longue période d'accumulation de tissu adipeux, ce qui expliquerait l'évolution vers un état d'obésité (53). Finalement, il a été proposé que l'âge auquel survient ce rebond peut être génétiquement programmé (54).

1.4 Complications associées à l'obésité

L'obésité est très souvent accompagnée par une morbidité aussi hétérogène que grave. Chez l'adulte, on y retrouve des complications respiratoires telles que l'insuffisance respiratoire et l'apnée du sommeil, des conditions chroniques invalidantes rhumatologiques ou ostéo-articulaires, des problèmes néphrologiques comme le syndrome néphrotique et la protéinurie, ainsi que des anomalies gastro-intestinales, telles que les lithiases ou le reflux gastro-oesophagien. Le risque de développer un cancer est également accru en présence d'obésité, notamment celui de la prostate et colorectal chez l'homme et de l'endomètre, des voies biliaires, du col de l'utérus, du sein et des ovaires chez la femme. Toutefois, les complications les plus fréquentes reliées à l'obésité sont les facteurs de risque cardiovasculaire, tels que l'hypertension, la dyslipidémie, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (1, 55).

Tout comme chez l'adulte, l'obésité chez les jeunes est associée à de nombreuses complications métaboliques (une dyslipidémie, la résistance à

l'insuline, le diabète de type 2), orthopédiques (la maladie de Blount), cutanées (des infections cutanées aux champignons, acanthosis nigricans), hépatiques (une stéatose et une stéato-hépatite), développementales (une croissance accélérée, une puberté précoce), et neurologiques (*pseudotumor cerebri*) (36, 39, 56, 57). L'obésité infantile et particulièrement celle de l'adolescence est un prédicteur important de l'obésité à l'âge adulte. De plus, la morbidité ainsi que la mortalité chez les adultes ayant présenté un excès de poids lors de l'adolescence sont plus élevées, et ce, malgré une perte de poids à l'âge adulte (57, 58).

Mis à part les complications somatiques, les enfants obèses présentent également des difficultés psychosociales comme la discrimination, une faible estime de soi, la solitude, une situation familiale défavorable et de plus faibles revenus. Très souvent, il s'agit d'un cercle vicieux où ces facteurs viennent aggraver l'état d'obésité (39, 56).

Le traitement de l'obésité infantile doit impliquer tous les membres de la famille puisque les parents sont les principaux responsables de l'achat et de la préparation des aliments, mais également de l'enseignement des habitudes alimentaires. En plus de promouvoir une alimentation équilibrée, les parents doivent encourager l'activité physique à laquelle les jeunes seront tenus de participer et l'adoption des habitudes de vie favorisant le jeune à maintenir un poids santé. En général, en vue d'un contrôle du poids chez le jeune, on suggère de combiner une diète riche en fibres, en fruits et légumes, réduite en matières grasses, limitée en sucreries, à une activité physique régulière et attrayante (39). Assurément, ces mesures devront être

accompagnées par un soutien psychologique de la part des parents, des collègues et des intervenants (36). La pharmacothérapie ou les mesures chirurgicales ne sont recommandées que dans les cas extrêmes (59, 60).

Toutefois, la mesure la plus efficace pour combattre l'obésité infantile demeure la prévention précoce et à ce niveau, les campagnes de santé publique devraient intervenir par l'initiation de programmes de sensibilisation auprès des jeunes et de leurs parents pour freiner le déploiement de cette pathologie qu'est l'obésité pédiatrique (36).

2) Résistance à l'insuline

2.1 Définition

L'insuline est activement impliquée dans une vaste gamme de phénomènes anaboliques : la mise en réserve et l'utilisation des substrats glucidiques, lipidiques ou protéiques, ainsi que la croissance et le contrôle de l'apoptose et du développement (61). Devant cette variabilité fonctionnelle de l'insuline, la définition la plus rigoureuse de la résistance à l'insuline a été celle proposée par Kahn (62) : "On peut dire que la résistance à l'insuline existe lorsque des concentrations normales de cette hormone produisent une réponse biologique amoindrie". Toutefois, l'utilisation terminologique courante fait plutôt référence à l'altération de la capacité de l'insuline à stimuler la captation tissulaire du glucose (63).

2.2 Déterminants de la sensibilité à l'insuline

La sensibilité à l'insuline présente une variabilité inter-individuelle considérable. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence certains éléments faisant partie des caractéristiques héréditaires ou des habitudes de vie et qui démontrent une association soutenue avec la sensibilité à l'insuline. On pourrait concevoir qu'une expression altérée ou une régulation anormale des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire de l'insuline ou de certains effecteurs métaboliques constitue la cause primaire de la résistance à l'insuline. Toutefois, cette dernière représente une manifestation hétérogène issue d'une combinaison de défauts génétiques et de la susceptibilité vis-à-vis de certains facteurs environnementaux (64, 65).

La composante génétique de la sensibilité à l'insuline a été démontrée par plusieurs stratégies. Premièrement, on peut citer les études ayant démontré la nature familiale de la résistance à l'insuline et effectuées soit chez des jumeaux (66), soit chez des individus présentant des liens familiaux plus éloignés. En deuxième lieu, on retrouve les études reliant la résistance à l'insuline à des gènes candidats ou à des régions chromosomiques, et finalement, on peut mentionner les observations effectuées au sein de populations homogènes. Le premier type d'études a permis de démontrer une concordance élevée du taux de diabète chez les jumeaux identiques, une insulino-résistance et une incidence de diabète plus élevée chez les parents non-diabétiques des individus atteints de diabète de type 2, et la ségrégation

familiale de la résistance à l'insuline. L'héritabilité de l'insulinémie à jeun a été estimée à 47-55% et celle de la résistance à l'insuline, à 66%. Ces données démontrent clairement l'influence génétique sur la sensibilité à l'insuline, mais il reste à savoir si cette contribution reflète la participation mineure de plusieurs gènes ou l'effet dominant d'un nombre réduit de gènes (67).

De cette manière, les stratégies visant à identifier la nature des gènes impliqués dans la détermination de la sensibilité à l'insuline comportent l'approche par gènes candidats et l'exploration du génome. Le nombre de gènes candidats pouvant avoir une influence sur la sensibilité à l'insuline est considérable, étant donné les nombreuses protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline ainsi que dans le métabolisme glucidique. Ceci a permis l'identification de près de 50 mutations du récepteur à l'insuline et de plusieurs éléments impliqués dans la cascade de signalisation de l'insuline affichant des effets marqués sur la résistance à l'insuline. Cependant, la fréquence de ces mutations est réduite et ne peut donc pas expliquer les formes communes de résistance à l'insuline (68). Le nombre de gènes candidats reliés à la résistance à l'insuline ne cesse d'augmenter et pour certains d'entre eux, il n'y a toujours pas de consensus en ce qui a trait à leur rôle exact dans la détermination de la sensibilité à l'insuline. En ce qui concerne les investigations au niveau du génome, elles ont permis de mettre en évidence plusieurs régions chromosomiques associées à la résistance à l'insuline, dont 3q23-24, 7q21-25 et 1p32-22, mais l'identité exacte des gènes compris dans ces régions demeure encore inconnue (65).

En dernier lieu, les évidences d'une contribution génétique dans la résistance à l'insuline dérivent de données démontrant une prévalence du diabète de type 2 moins élevée chez les individus provenant d'une population mixte par rapport à certaines populations plus homogènes. Cet aspect a été documenté chez les Indiens Pima, les Nauru et les Mexicains-Americains, ce qui met également en lumière la contribution de l'origine ethnique dans la résistance à l'insuline (69-70).

Le premier facteur environnemental prédisposant à la résistance à l'insuline est l'obésité et les détails de cette association seront présentés au fil des chapitres de cet ouvrage. De plus, tel que mentionné dans la section 1.2, mis à part un surpoids global, la contribution de l'obésité de type androïde dans la résistance à l'insuline est particulièrement apparente. L'étroite relation entre l'obésité et la résistance à l'insuline est présente autant chez l'adulte que chez l'enfant et l'adiposité dans l'enfance et plus particulièrement dans l'adolescence est un indicateur important de l'obésité et de la résistance à l'insuline à l'âge adulte (71).

La croissance dramatique des pathologies reliées à la résistance à l'insuline a augmenté l'intérêt d'étudier l'effet des composantes diététiques sur la sensibilité à l'insuline. Mis à part les différentes classes d'acides gras, dont les effets sont détaillés dans la section 5.7, d'autres nutriments comme la protéine de soya (72), plusieurs minéraux et acides aminés, ainsi que l'acide lipoïque pourraient jouer un rôle dans la détermination de la sensibilité à l'insuline (73).

Tout comme pour l'obésité, l'origine fœtale de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 est très bien documentée. Plusieurs évidences démontrent qu'un environnement intra-utérin hostile affecte la sensibilité à l'insuline plus tard dans la vie en plus d'être associé à une haute tension artérielle, un diabète de type 2, une dyslipidémie et un taux élevé de mortalité relié aux maladies cardiovasculaires (42, 43). Parmi les éléments faisant partie de cet environnement, on peut citer la présence d'un diabète gestationnel ainsi que le poids du fœtus à la naissance. Premièrement, le risque d'avoir un diabète de type 2 et une obésité à l'adolescence, est considérablement augmenté chez les sujets nés d'une grossesse accompagnée d'un diabète gestationnel. Chez les Indiens Pima, le risque de diabète chez les enfants nés d'une telle grossesse est quatre fois plus élevé que chez les enfants dont les mères n'ont pas dévelloppé de diabète gestationnel. En réalité, on estime que dans cette population, près de 40% des cas de diabète de type 2 diagnostiqués chez les jeunes de 5 à 19 ans sont attribués au diabète maternel durant la grossesse (588).

En deuxième lieu, il existe une relation inverse entre le poids du fœtus à la naissance et la sensibilité à l'insuline. Ainsi, les enfants présentant un petit poids à la naissance détiennent un risque élevé de développer un diabète de type 2 à l'âge adulte et de plus fréquentes complications associées à une résistance à l'insuline (69).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le lien entre un faible poids à la naissance et la résistance à l'insuline. Tout d'abord, Hales *et coll.* (586) ont supposé qu'un état de malnutrition survenant *in utero* pourrait

conduire à un développement anormal de la masse pancréatique de cellules β, suivie par une hyposécrétion insulinique, mais cette hypothèse n'a pu être validée par des études épidémiologiques. En outre, on présume que l'intolérance au glucose retrouvée chez ces enfants serait secondaire à la résistance à l'insuline. Il s'agit d'un lien de causalité, puisque des études effectuées chez des jumeaux ou des adultes exposés à une famine lors de la période *in utero* ont démontré qu'une croissance altérée était responsable de la résistance à l'insuline et du diabète et non l'inverse (74). Finalement, l'évolution vers une résistance à l'insuline des enfants de faible poids à la naissance dépend de l'interaction avec l'obésité à l'âge adulte (69). À ce niveau, les principes de l'hypothèse des origines fœtales relatifs au développement de l'obésité s'appliquent également à la résistance à l'insuline.

Cette croissance fœtale inadéquate a donné naissance à un syndrome, le syndrome du petit nouveau-né, regroupant l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et l'hypertension et qui diffère du syndrome de résistance à l'insuline par l'absence des désordres lipidiques (69). L'association entre le petit poids à la naissance et la sensibilité à l'insuline ainsi que plusieurs autres composantes du syndrome de résistance à l'insuline a été mise en évidence au sein de plusieurs populations dont les Indiens (75), les Africain-Americains, les Sud-Africains, les Indiens Pima (76) et les Caucasiens (77).

L'âge est également un déterminant important de la résistance à l'insuline (78). Il est bien connu que la sensibilité à l'insuline décroît avec l'âge

et une des explications réside dans la perturbation des systèmes endocriniens impliquant le cortisol, l'hormone de croissance et les hormones sexuelles (79). La capacité du cortisol à induire la résistance à l'insuline est aujourd'hui bien démontrée. En effet, le cortisol agit sur le métabolisme adipocytaire en stimulant la lipoprotéine lipase (LPL), l'enzyme-clé intervenant dans la captation lipidique. Par ailleurs, dans l'obésité viscérale accompagnée par une hyperinsulinémie, la libération des lipides est inhibée par les taux élevés d'insuline qui amplifient également l'effet lipogénique. Par contre, les hormones sexuelles (la testostérone et les œstrogènes) et l'hormone de croissance ont des effets antagonistes à ceux du cortisol, en favorisant la mobilisation lipidique. L'accumulation de tissu adipeux viscéral dépend donc de l'équilibre entre les deux classes d'hormones : d'une part, l'insuline et le cortisol et de l'autre, les hormones sexuelles et l'hormone de croissance. Comme les niveaux des hormones sexuelles et de croissance diminuent avec l'âge en laissant la sécrétion de cortisol inchangée, l'accumulation de tissu adipeux viscéral augmente en affectant la sensibilité à l'insuline (22).

La puberté est une autre période accompagnée par des changements dans la quantité et la distribution de la graisse corporelle ainsi que par une diminution transitoire de la sensibilité à l'insuline (80-82).

L'impact favorable de l'activité physique sur la sensibilité à l'insuline est bien documenté. Même si le mécanisme sous-jacent n'a pas été entièrement élucidé, certains éléments pourraient expliquer le rôle de l'activité physique dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline : la perte de poids,

l'augmentation du contenu du transporteur de glucose de type 4 (GLUT-4) et de l'activité de la glycogène synthase dans le muscle squelettique (83-85).

2.3 Méthodes d'évaluation de la résistance à l'insuline

La sensibilité à l'insuline est un paramètre essentiel en tant que marqueur d'un risque cardiovasculaire potentiel. Plusieurs techniques de complexité variable sont présentement disponibles pour l'évaluation de la résistance à l'insuline, et leur choix dépend du type d'information recherchée ainsi que du type d'étude effectuée.

Malgré le nombre élevé de méthodes développées à travers le temps, le standard par excellence demeure le clamp euglycémique hyperinsulinémique, décrit par DeFronzo, en 1979. Cette méthode est basée sur une perfusion d'insuline couplée à une administration variable de glucose, oscillant de manière à maintenir une glycémie constante (86). Ce test peut être couplé à d'autres techniques comme l'utilisation d'isotopes stables de glucose pour en mesurer l'utilisation ou la calorimétrie indirecte pour en déterminer l'oxydation (87). Une alternative bien validée de ce test est l'hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse avec analyse par une modélisation mathématique de la cinétique des glycémies, connue sous le nom de Modèle minimal de Bergman et permettant d'évaluer simultanément la sécrétion et la sensibilité à l'insuline (88). Cependant, il s'agit d'une méthode assez lourde, ce qui soulève le besoin d'appliquer des techniques plus simples, notamment en clinique.

Parmi ces dernières, on retrouve les indices obtenus grâce à la perfusion continue de glucose, test connu aussi sous le nom de Continuous Infusion of Glucose with Model Assessment (CIGMA), aux prélèvements à jeun et suite à l'administration d'insuline. La première méthode est basée sur la perfusion continue de glucose jusqu'à l'obtention d'un plateau de glycémie et d'insulinémie. Les valeurs de glycémie et d'insulinémie ainsi obtenues sont introduites dans un modèle mathématique structurel, ce qui permet d'évaluer l'insulinosécrétion et l'insulinsensibilité (89). En ce qui a trait aux indices obtenus à l'aide de prélèvements à jeun, ils sont basés sur la présomption qu'en présence d'une résistance à l'insuline, on assiste à une augmentation compensatoire de l'insulinosécrétion et donc de l'insulinémie à jeun permettant le maintien de l'homéostasie glucidique. Il est essentiel que ces paramètres soient utilisés lorsque la fonction des cellules β est intacte, puisqu'un déficit insulinosécrétoire se traduisant par une hyperglycémie diminue significativement leur valeur (90). Parmi ces ratios, les plus couramment utilisés et les mieux validés dans le cadre d'études épidémiologiques sur de larges populations sont le Homeostasis Model Assessment (HOMA) et l'insulinémie à jeun. Le premier est un modèle mathématique (Insuline/22.5 $e^{-Lnglycémie}$) basé sur les réponses quantitatives des principaux organes impliqués dans l'homéostasie glucidique bien corrélé avec le clamp euglycémique (91). En ce qui a trait à la valeur de l'insulinémie à jeun, elle offre l'avantage d'une mesure simple et applicable en pratique clinique, bien corrélée avec l'indice de sensibilité à l'insuline mesuré par le clamp euglycémique hyperinsulinémique (92). Par contre, cette mesure à

jeun ne peut être utilisée que lorsque la glycémie à jeun est normale et si on suspecte une déficit insulino-sécrétoire, il faut considérer une alternative plus fiable.

Une autre méthode récemment établie par l'équipe de Katz (93) basée sur les valeurs des concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose à jeun est le Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) dont la formule est $1/[\log (I_o) + \log (G_o)]$, où I_o et G_o désignent les valeurs d'insulinémie et de glycémie à jeun. Quoique très semblable au test HOMA, elle offre l'avantage de normaliser la distribution des valeurs d'insuline souvent déformée (91), en plus d'être fortement corrélée avec l'insulinémie à jeun (94) et avec les données obtenues par clamp glycémique (93). L'index QUICKI montre une corrélation avec la sensibilité à l'insuline obtenue lors du clamp, nettement meilleure que celle du test HOMA (90). De plus, à la différence de l'index HOMA, sa validité est optimale avec un seul prélèvement. Malgré une bonne corrélation avec la sensibilité à l'insuline au niveau populationnel, l'utilisation de ces indices demeure problématique lorsqu'il d'agit d'un effectif plus restreint ou d'une application au niveau individuel (90).

La troisième catégorie de ces tests, soit celle impliquant l'administration d'insuline comporte le test de tolérance intraveineuse à l'insuline et le test de suppression insulinique. Le premier permet de déterminer un indice à partir de la décroissance de la glycémie au cours des 15 ou 30 minutes, suivant l'administration d'insuline. Le deuxième, quant à lui, consiste à perfuser de manière simultanée du glucose, de l'insuline et de

la somatostatine utilisée pour inhiber la sécrétion endogène d'insuline. La sensibilité à l'insuline est reflétée par la glycémie en fin de test, dénommée Steady state plasma glucose (SSPG), qui est inversement proportionnelle au degré de sensibilité à l'insuline dans les tissus (90, 95).

Dans le cadre d'études impliquant une population pédiatrique, les méthodes utilisées pour l'évaluation de la résistance à l'insuline sont beaucoup moins documentées que chez l'adulte. Chez les jeunes, les deux méthodes standard sont le clamp euglycémique et le modèle minimal (96, 97). Les tests couramment utilisés, tels que l'insulinémie à jeun, le test HOMA et QUICKI présentent de bonnes et assez comparables corrélations avec les méthodes de référence, autant chez les jeunes ayant un poids corporel normal que chez ceux qui présentent un surpoids, réflétées par des valeurs des coefficients de Spearman variant entre 0.67 et 0.92, 0.51-0.91, ainsi que 0.69-0.91, respectivement (98, 589-591). Par contre, chez les enfants prématurés ou de petit poids à la naissance, l'indice QUICKI s'est avéré être une mesure moins précise que le test HOMA (96). Dans notre étude, le test HOMA ne semble pas plus informatif que l'insulinémie à jeun en tant qu'indicateur de la résistance à l'insuline (99).

3) Syndrome de résistance à l'insuline

Il y a près de 20 ans, Gerald Reaven introduisait le concept de syndrome de résistance à l'insuline connu également sous le nom de

syndrome X ou syndrome métabolique pour définir un regroupement d'anomalies métaboliques qui surviennent chez le même individu : une résistance à l'insuline, une hyperinsulinémie compensatoire, une dyslipidémie caractéristique incluant une hypertriglycéridémie et des taux abaissés de High Density Lipopoprotein-Cholesterol (HDL-C), une hypertension essentielle, une obésité abdominale, ainsi qu'une intolérance au glucose ou un diabète de type 2 (100). Ce syndrome, plus fréquent chez les hommes, est associé à un risque cardiovasculaire très élevé (101) et peut précéder de 10 ans l'apparition d'un diabète de type 2. Par conséquent, une détection et une prise en charge précoces de ce syndrome se révèlent d'une importance considérable pour la prévention du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Des données de l'étude Botnia stipulent que le syndrome de résistance à l'insuline est présent chez près de 10% des sujets normo-glycémiques, 40% de ceux avec une intolérance au glucose et 70% des patients présentant un diabète de type 2 (101, 102). En 2000, on estimait que plus de 47 millions d'Américains présentaient un syndrome de résistance à l'insuline (103).

Au cours des dernières années, d'autres éléments se sont ajoutés, reflétant des anomalies hémostatiques telles qu'une élévation du Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) et du fibrinogène, une hyperuricémie, une accentuation de la lipémie post-prandiale, la formation de particules LDL petites et denses et un état pro-inflammatoire (une élévation des niveaux de protéine C-réactive (CRP) ou de certaines cytokines comme le TNF-α) (104, 105). De plus, même si l'insulino-résistance ou

l'hyperinsulinémie était initialement considérée comme le facteur étiologique commun à plusieurs des composantes du syndrome métabolique, les données subséquentes ont montré une forte hétérogénéité de cette association entre diverses populations (106).

Devant la complexité des éléments constituant le syndrome de résistance à l'insuline et la nécessité de mettre à la disposition du clinicien des outils simples pour un dépistage rapide et exact de ce syndrome, trois définitions dont les détails sont présentés dans le tableau III ont été proposées par l'OMS (1999) (107), le National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel (NCEP-ATP-III) (2001) (108) et l'European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) (2002) (109). Elles s'entendent toutes sur l'inclusion de certains éléments de base, mais elles comportent quelques différences spécifiques. Parmi ces trois définitions, celle émise par le NCEP est la plus pratique, puisqu'elle repose sur les analyses à jeun et ne fait pas appel à l'utilisation de techniques plus laborieuses pour l'estimation de la résistance à l'insuline.

Tableau III : Syndrome de résistance à l'insuline : définitions proposées

	OMS 1999	NCEP:ATP-III 2001	EGIR 2002
Critères	Diabète de type 2 ou Intolérence au glucose et/ou insulino-résistance + 2 des critères suivants :	3 des critères suivants :	Insulino-résistance ou hyperinsulinémie (sujets non diabétiques seulement) + 2 des critères suivants :
Hypertension	Tension artérielle >140/90 mmHg et/ou medication anti-hypertensive	Tension artérielle >130/85 mmHg et/ou medication anti-hypertensive	Tension artérielle >140/90 mmHg et/ou medication anti-hypertensive
Dyslipidémie	TG >1.7 mmol/l et/ou HDL-C <0.9 (H), <1.0 (F) mmol/l	TG>1.7 mmol/l et/ou HDL-C: <1.04 (H), <1.29 (F) mmol/L	TG>2.0 mmol/l et/ou HDL-C <1.0 mmol/l ou Traité pour la dyslipidémie
Obésité	IMC>30kg/m^2 et/ou T/H >0.9 (H), 0.85 (F)	Circonférence de la taille >102cm (H), >88cm (F)	Circonférence de la taille >94cm (H), >80cm (F)
Hyperglycémie		Glycémie à jeun >6.1 mmol/l	Glycémie à jeun >6.1 mmol/l
Micro-albuminurie	AER > 20 ìg/min		

Abréviations : AER : Albumin excretion rate; F : Femme; H : Homme; IMC : Indice de masse corporelle; TG : Triglycérides; T/H : Tour de taille/Tour de hanche

Malgré l'abondance des données concernant l'obésité, l'incidence des maladies cardiovasculaires et la résistance à l'insuline, peu d'études ont visé le syndrome de résistance à l'insuline chez l'enfant. Bien qu'une définition précise du syndrome de résistance à l'insuline chez les enfants et adolescents ne soit pas encore disponible, plusieurs éléments augurent d'une présence de ce syndrome dans la population pédiatrique. Dans ce sens,

l'obésité débutant dans l'enfance précède souvent un état hyperinsulinique et la présence concomitante d'autres éléments du syndrome de résistance à l'insuline comme l'hypertension et un profil lipidique altéré a été identifiée chez les jeunes. Parmi les plus importantes études épidémiologiques faisant état de la présence d'un regroupement de facteurs de risque cardiovasculaire chez les enfants et adolescents on peut citer la Bogalusa Heart Study et l'Étude des facteurs de risque cardiovasculaire chez les jeunes Finnois. La première (110-113) est une enquête transversale visant l'étude des risques cardiovasculaires dans l'enfance dans une communauté biraciale, pour un total de près de 22 000 sujets, qui a débuté en 1973 et dont la collecte de données a pris fin en 2005. Elle a permis d'établir une relation entre l'insulinémie à jeun et l'IMC, la triglycéridémie, la glycémie, les tensions artérielles systolique et diastolique, les niveaux de Very Low Density Lipoproteins (VLDL), de HDL-C et de Low Density Lipoprotein-Cholesterol (LDL-C), (110, 112, 113), chez les enfants et les jeunes âgés de 5 à 30 ans. Subséquemment, dans le but d'identifier les principaux facteurs sous-jacents au syndrome de résistance à l'insuline, les auteurs ont procédé à une analyse factorielle. Cette méthode leur a permis de suggérer que dans cette population, le syndrome de résistance à l'insuline est caractérisé pas une association entre une entité métabolique représentée par l'hyperinsulinémie ou la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'obésité et un facteur hémodynamique comme l'hypertension (111). La deuxième étude a été effectuée sur un groupe de près de 4000 jeunes Finnois âgés de 3-18 ans ayant débuté en 1980 et dont la dernière collecte de données a été

complétée en 2001. Quoique de moindre envergure que l'étude Bogalusa, l'objectif de cette enquête est sensiblement le même, soit d'identifier des précurseurs de l'athérosclérose dès l'enfance et jusqu'à l'âge adulte. Les auteurs ont ainsi identifié un regroupement de facteurs de risque comme l'obésité, l'hypertension artérielle, des taux réduits de HDL-C et l'hypertriglycéridémie chez près de 12% des sujets (114, 115), et des taux insuliniques prédisant le rassemblement de ces facteurs de risque cardiovasculaire associés au syndrome de résistance à l'insuline (116). D'autres études de moindre envergure révèlent la présence simultanée des variables du syndrome de résistance à l'insuline chez les enfants Mexicains-Américains et Africains-Américains (117), Chinois (118), Australiens (119), Allemands (120), Espagnols (121) et Polonais (122). Dans ces populations, la prévalence du syndrome de résistance à l'insuline présente des variations en fonction de la définition utilisée ou du groupe ethnique étudié. Par contre, il est important de noter que, peu importe les critères employés, un regroupement de facteurs de risque cardiovasculaire est retrouvé chez près de 30% des jeunes présentant un surpoids corporel et 50% des jeunes affichant une obésité franche (597-600).

Toutes ces études évoquent le rôle central de l'obésité et de la résistance à l'insuline en tant qu'éléments prépondérants du syndrome de résistance à l'insuline se manifestant également dans l'enfance. Plus spécifiquement, des corrélations ont été établies entre la distribution de la graisse corporelle et les risques cardiovasculaires. Chez les enfants et

adolescents, une accumulation de tissu adipeux dans la région abdominale a été associée à un profil lipidique, une tension artérielle et une insulinémie défavorables (123-125), ce qui suggère que la circonférence de la taille pourrait constituer un outil de prédiction du syndrome de résistance à l'insuline à usage clinique (126). Un aspect important à mentionner est que ces associations se présentent sous la forme d'un regroupement transmis par voie parentale (127) et de l'enfance à l'âge adulte, en présentant quelques variations en fonction de l'âge, très probablement reliées aux modifications relatives à l'obésité et à la résistance à l'insuline évoluant avec l'âge (128-131). En tenant compte du risque élevé des maladies cardiovasculaires relié à l'hypertension et aux anomalies lipidiques, et de la présence d'athérosclérose aortique et coronarienne identifiée lors des autopsies chez l'enfant, il est très raisonnable de présumer que l'interaction entre la résistance à l'insuline et les autres facteurs de risque trouve ses racines très tôt dans l'enfance, probablement dans les deux premières décennies de vie. Par ailleurs, dans un contexte où l'obésité pédiatrique affiche des proportions de plus en plus inquiétantes, il est essentiel de développer une définition complète et précise du syndrome de résistance à l'insuline chez l'enfant et des outils permettant un dépistage simple et efficace de ce syndrome.

4) Métabolisme lipidique

4.1 Métabolisme intestinal des lipides

Les lipides constituent un élément principal du régime alimentaire. Mis à part leur propriété de servir de substrat énergétique, ils aident à l'absorption des vitamines liposolubles et des acides gras essentiels par l'intestin et jouent un rôle important dans la formation et la structure des membranes cellulaires ou de composés d'importance physiologique tels que la sphyngomyéline. Toutefois, dans les pays industrialisés, une diète riche en lipides est directement associée aux pathologies les plus prévalentes comme les maladies cardiovasculaires et certains types de cancer, comme celui du côlon, de la prostate, du sein et de l'estomac (132). Pour cette raison, la plupart des recommandations nutritionnelles mettent l'accent sur la réduction de la consommation de lipides pour promouvoir un état de santé favorable et prévenir la survenue de ces maladies (133, 134). Dans une diète typiquement Nord-américaine, la limite de 30% de l'apport énergétique conféré par les lipides est largement dépassée atteignant parfois le seuil de 40% (135), et est constituée majoritairement de triglycérides (TG). Assurément, une distinction est à faire entre les effets bénéfiques de certains types d'acides gras comme les acides gras monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI), particulièrement ceux de la série ω-3, et l'impact néfaste des acides gras saturés (AGS) ou *trans* (132, 136).

Étant donné la nature hydrophobe les lipides, leur absorption et métabolisme subséquent dépendent étroitement des évènements permettant une solubilisation intestinale. Ce processus débute par la mastication, suivie par une hydrolyse des TG par la lipase gastrique. Les produits de digestion des TG retrouvés dans la lumière gastrique sont les diglycérides et les acides gras libres. Par la suite, au niveau duodénal, on assiste à une sécrétion de bile et de suc pancréatique dont les rôles sont essentiels à l'émulsification lipidique et à la formation de fines gouttelettes lipidiques. Parallèlement, la lipase pancréatique agit sur ces gouttelettes pour hydrolyser spécifiquement les acides gras en position 1 et 3 des TG. Les produits de cette hydrolyse s'associent par la suite aux sels biliaires et forment des particules plus petites et hydrosolubles appelées micelles. Ces dernières permettent non seulement la solubilité des graisses, mais elles facilitent également le transport et la livraison des produits de la digestion (acides gras libres, 2-monoacylglycérols et de petites quantités de 1-monoacylglycérol) aux cellules épithéliales intestinales. En effet, au niveau entérocytaire, les acides gras et les monoglycérides sont absorbés lorsqu'ils sont à l'état libre en solution et grâce à un échange constant entre les suspensions micellaires et la fraction en solution libre, de petites quantités de produits d'hydrolyse sont continuellement disponibles pour l'absorption (137, 138). La libération des acides biliaires suite à l'absorption des lipides stimulera la formation de nouvelles micelles. Par conséquent, la formation de micelles est d'une importance capitale pour l'absorption intestinale des lipides. Jusqu'à très récemment, il était généralement accepté qu'en quittant la lumière intestinale,

les acides gras et les monoglycérides pénètrent la membrane en brosse simplement par diffusion passive. Cependant, de récents travaux font état de la présence de protéines trans-membranaires permettant le transport des acides gras à travers la membrane plasmique. Trois candidats font maintenant l'objet d'études plus approfondies : la Plasma membrane fatty acid – binding protein (FABPpm), la Fatty acid translocase (FAT/CD36) et la Fatty acid transporter protein 4 (FATP4) et les données disponibles militent en faveur d'un transport actif modulé par ces protéines, notamment dans les tissus clé (139-141). On ne connaît pas encore avec exactitude la manière dont les composés lipidiques absorbés, une fois dans l'entérocyte, arrivent au réticulum endoplamique (RE) où aura lieu la biosynthèse des lipides plus complexes et la formation de lipoprotéines ou vers les mitochondries et les peroxysomes en vue de l'oxydation. Cependant, on pense que les Fatty acid binding proteins (FABP), des protéines cytosoliques se liant aux acides gras sont activement impliquées dans ce processus (142, 143). Des détails concernant cette classe de protéines seront présentés dans la section prévue à cet effet.

4.2 Métabolisme des lipoprotéines

L'utilisation de l'ultracentrifugation analytique a permis, dans les années '50 et '60, l'identification de complexes plasmatiques servant au transport des lipides : les lipoprotéines. Ce sont généralement des particules sphériques contenant un noyau hydrophobe constitué surtout de molécules

de cholestérol ester et de TG, entouré d'une surface plus hydrophile composée d'apolipoprotéines (apos), de phospholipides (PL) et de cholestérol libre. Les apos, par leur nature amphipathique permettent la solubilisation des lipides non-polaires et sont essentielles à leur transport et métabolisme dans le milieu sanguin. En fait, elles détiennent un rôle actif dans le métabolisme des lipoprotéines en agissant également comme co-facteurs de certaines enzymes et en tant que ligands pour les récepteurs lipoprotéiniques. Tel que décrit dans le tableau IV, l'hétérogénéité des lipoprotéines reflète des différences au niveau de leur source, composition, taille, densité, fonction et métabolisme (144).

Tableau IV: Caractérisation des différentes classes de lipoprotéines

Classe de lipoprotéines	*Densité (g/ml)*	*Lipides majoritaires*	*Apolipoprotéines*	*Source*
Chylomicrons	0.93	TG	apoB-48, apo C-I, apoC-III, apo E, apo A-I, apo A-IV	Intestin
VLDL	0.93-1.006	TG	apoB-100, apoC-I apoC-II, apoC-III, apo E	Intestin et foie
IDL	1.006-1.019	TG et cholestérol	apoB-100, apoC-I apoC-II, apoC-III, apo E	Hydrolyse des VLDL
LDL	1.019-1.063	Cholestérol	apoB-100	Hydrolyse des IDL, foie
HDL_2	1.063-1.125	Protéines et PL	apoA-I, apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apo E	Foie, intestin et plasma
HDL_3	1.125-1.210	Protéines et PL	apoA-I, apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apo E	Foie, intestin et plasma

Adapté de Kwiterovich, 2002 (144)

Abréviations : Apo : apolipoprotéine; HDL : High Density Lipoprotein; HDL_2 : HDL de grande taille; HDL_3 : HDL de petite taille; IDL : Intermediate Low Density Lipoprotein; LDL : Low Density Lipoprotein; PL : Phospholipides; TG : Triglycérides; VLDL : Very Low Density Lipoprotein.

4.2.1 Chylomicrons :

La synthèse des chylomicrons est une des caractéristiques majeures des entérocytes. Il s'agit d'une classe de lipoprotéines de très grande taille,

contenant plus de 90% de leur poids sous forme de TG, dont le rôle est de transporter les lipides d'origine alimentaire.

Lors des étapes précoces de sa formation, le chylomicron requiert la présence de l'apo B-48. La synthèse de cette dernière est constitutive, mais modulée par des processus co- et post-translationnels. L'apo B-48 est intégrée de manière co-translationnelle aux membranes du RE. L'ajout de lipides subséquent autour de l'apo B prévient sa dégradation par les protéases du protéasome, permet sa libération dans la lumière du RE et initie la formation de la lipoprotéine. La protéine-clé responsable de cet ajout des lipides à la molécule d'apo B-48 est le Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) (145). Les aspects détaillés concernant le MTP seront décrits dans le cadre d'une section ultérieure.

Plusieurs étapes relatives à l'assemblage des chylomicrons demeurent énigmatiques malgré les récents progrès. De nombreuses hypothèses ont été cependant émises pour expliquer les événements associés à la synthèse entérocytaire des chylomicrons. Le modèle général proposé stipule la formation séquentielle des chylomicrons en trois étapes: constitution d'une particule primaire de taille réduite et contenant l'apo B-48, suivie par l'élaboration de gouttelettes lipidiques de différentes tailles, et la fusion de la particule avec ces gouttelettes pour produire le chylomicron (146).

Suite à leur formation (Fig 1), les chylomicrons sont sécrétés dans la circulation lymphatique, avant d'atteindre le compartiment sanguin. Une fois dans la circulation, ils participent à un échange d'apos avec les autres classes de lipoprotéines et subissent la dégradation des TG sous l'action de

la LPL. Ils voient ainsi leur taille diminuer graduellement jusqu'à leur transformation en résidus de chylomicrons (R-CM). Les acides gras ainsi libérés, parviennent aux tissus et sont entreposés sous forme de TG dans le tissu adipeux ou oxydés dans le muscle pour la production d'énergie. Par la suite, les R-CM s'enrichissent en apo E et ils seront captés par le foie. À ce niveau, les principaux récepteurs impliqués sont le LDL-receptor related protein (LRP) et le récepteur des LDL ou B/E qui reconnaissent l'apo E précédemment acquise par le R-CM. Suite à la captation des R-CM par le foie, leur contenu en TG et en cholestérol ester subira une hydrolyse, ce qui permet la régulation de la synthèse des lipides intra-hépatocytaires (144, 147).

4.2.2 Very Low Density Lipoproteins (VLDL)

Les VLDL sont aussi des lipoprotéines de grande taille et riches en TG. Cependant, elles diffèrent des chylomicrons sur plusieurs plans: elles sont majoritairement synthétisées par le foie, elles transportent les lipides d'origine endogène et elles contiennent l'apo B-100 comme apo structurale principale. La formation hépatique des VLDL ressemble au processus de synthèse des chylomicrons, malgré quelques dissemblances. Ainsi, elle reflète plutôt la biosynthèse de cholestérol et de TG dans le foie ou la disponibilité des PL et du cholestérol libre nécessaires à la formation de la monocouche lipidique à la surface de la lipoprotéine (148).

En ce qui concerne leur catabolisme, les VLDL sont exposés à la même cascade lipolytique régie par la LPL et on assiste ainsi à la formation des Intermediate Low Density Lipoproteins (IDL) (144, 149).

4.2.3 Intermediate Low Density Lipoprotein (IDL):

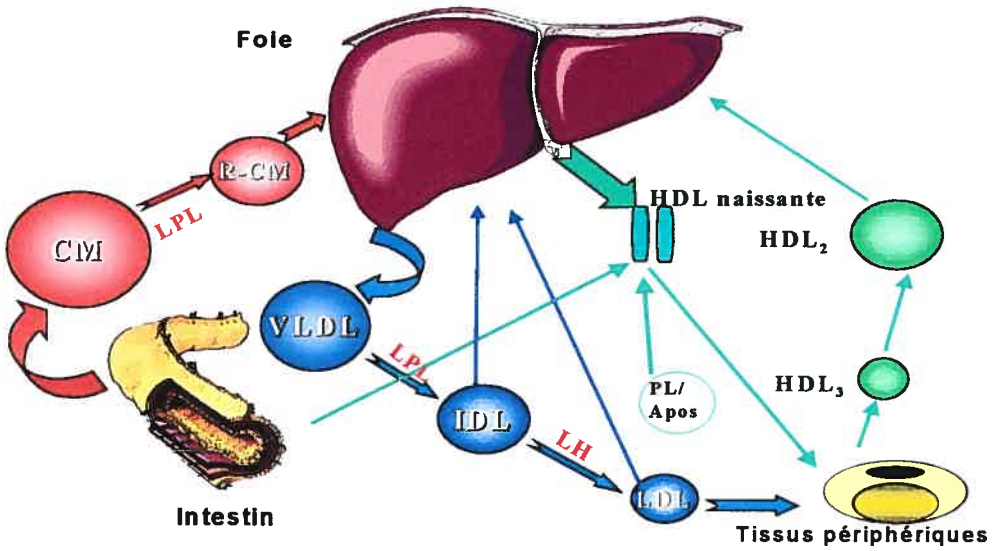
Suite à leur formation, les IDL ont la possibilité d'emprunter deux voies. Premièrement, elles peuvent être captées par le foie, par la liaison de l'apo E au récepteur LDL (B, E) hépatique, ce qui permet leur élimination de la circulation sanguine. Par contre, elles peuvent également subir une lipolyse complète sous l'action de la lipase hépatique (LH) et prendre ainsi la forme de particules LDL, le principal transporteur de cholestérol aux tissus périphériques.

4.2.4 High Density Lipoproteins (HDL):

La fonction principale des HDL est de transporter le cholestérol des cellules périphériques vers le foie, processus également appelé transport inverse du cholestérol, qui contribue significativement à la protection contre l'athérosclérose. Les HDL comportent plusieurs sous-classes. À l'origine, des particules discoïdales contenant l'apo A-I, des PL et une très faible quantité de cholestérol sont sécrétées par le foie et l'intestin ou formées dans le plasma à partir d'éléments, notamment de PL et d'apos, libérés lors de la

dégradation des lipoprotéines circulantes. L'apo A-I présente à la surface de ces HDL naissantes interagit avec l'ATP-binding-cassette-1 (ABC1), un transporteur permettant le transfert de cholestérol libre de la cellule vers la particule de HDL. Le cholestérol libre est ensuite estérifié sous l'action de la Lecithin-cholesterol acyl transférase (LCAT) et entreposé dans le noyau de la lipoprotéine. Cette dernière est alors transformée en une particule mature, sphérique, nommée HDL_3. L'enrichissement ultérieur en TG des HDL_3 donne naissance à des particules plus larges et plus matures, les HDL_2. Subséquemment, le cholestérol ester est délivré au foie et aux organes responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes, et ce, suite à l'interaction de l'apo A-I avec le récepteur scavenger de type B1 (SR-B1). D'autre part, le cholestérol ester peut être transféré, sous l'action de la Cholesteryl ester transfer protein (CETP), à des particules contenant l'apo B, en échange de TG, qui seront ensuite captées et internalisées via le récepteur LDL (B, E). Ainsi, la particule de HDL déchargée en partie de son contenu en cholestérol peut reprendre le même cycle d'actions (150-151).

Figure 1 : Métabolisme des lipoprotéines



Légende :

Parcours des chylomicrons : une fois sécrétés par l'intestin, ils se vident graduellement de leur contenu en TG, sous l'action de la LPL et deviennent des R-CM qui seront captés par le foie.

Parcours des VLDL : suite à leur sécrétion hépatique, leur contenu en TG sera hydrolysé sous l'action de la LPL, ce qui donnera naissance aux IDL. Ces dernierès peuvent se diriger vers le foie ou continuer leur parcours vers la formation de LDL en cédant, une fois de plus leur contenu triglyceridémique, par un processus modulé par la LH. Les LDL ainsi formées pourront être captées par le foie ou par les tissus périphériques.

Parcours des HDL : elles sont sécrétées par le foie, l'intestin ou formées à partir de composés plasmatiques comme les apos et les PL. Initialement de forme discoïdale, elles s'enrichissent en cholestérol au niveau des tissus extra-hépatiques, devenant ainsi des HDL_3. Subséquement, ces dernières acquierent des TG et deviennent des HDL_2.

Abréviations : Apo : apolipoprotéine; HDL : High Density Lipoprotein; HDL_2 : HDL de grande taille; HDL_3 : HDL de petite taille; IDL : Intermediate Low Density Lipoprotein; LDL : Low Density Lipoprotein; LH : Lipase hépatique; LPL : Lipoprotéine lipase; PL : Phospholipides; R-CM : Résidu de chylomicron; TG : Triglycérides; VLDL : Very Low Density Lipoprotein.

5) Rôle des acides gras dans la résistance à l'insuline

Le syndrome de résistance à l'insuline et le diabète de type 2 ont deux caractéristiques communes qui les interrelient : la résistance à l'insuline et des désordres du métabolisme lipidique tels que l'hypertriglycéridémie accompagnée par une élévation des TG dans plusieurs tissus tels que le muscle ou les cellules β-pancréatiques et, parfois, une élévation des taux plasmatiques d'acides gras libres (152). Ainsi, le diabète de type 2 est autant une pathologie de nature lipidique que glucidique et il est très probable que des niveaux augmentés de lipides expliquent non seulement la résistance à l'insuline, mais aussi la dysfonction de la cellule β-pancréatique (153, 154).

Malgré certaines évidences, le rôle exact des matières grasses dans la physiopathologie de la résistance à l'insuline n'est pas encore établi avec certitude. Il est donc essentiel de poursuivre des études concernant l'implication exacte des acides gras dans le développement de l'obésité, de la résistance à l'insuline et ultimement, du diabète de type 2 (155). Ainsi, dans le cadre de cette section, nous examinerons de près l'association entre les acides gras, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène et la résistance à l'insuline en mettant l'emphase sur leurs effets directs sur le métabolisme glucidique et lipidique, notamment en période post-prandiale, sur la sécrétion d'insuline et sur l'intégrité de la cellule β-pancréatique. Nous mettrons

également en lumière le tissu adipeux en tant que site de production de nombreux facteurs modulant la sensibilité à l'insuline.

5.1 Muscle

La résistance à l'insuline au niveau du muscle a une composante héréditaire (ex: mutation du récepteur à l'insuline ainsi que des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire de l'insuline ou le transport du glucose). Toutefois, les acides gras ont le pouvoir intrinsèque de provoquer la résistance à l'insuline dans le muscle (156). En effet, en 1963 émergea l'hypothèse de Randle, démontrant l'existence d'une compétition entre le glucose et les acides gras libres en tant que substrats énergétiques consommés par le muscle. Ainsi, une élévation dans la concentration des acides gras conduirait vers une meilleure captation et oxydation par le muscle, ce qui inhiberait le transport du glucose et la synthèse de glycogène, et causerait ainsi une hyperinsulinémie et une résistance à l'insuline (69, 157, 158). Par ailleurs, les acides gras exercent un effet direct sur la signalisation intracellulaire de l'insuline, traduit à la fois par une diminution du nombre et de l'affinité des récepteurs de cette hormone et par l'activation des membres de la famille des protéine kinase C (PKC), connus pour leur atténuation de la signalisation de l'insuline (159, 160) ainsi que pour leur inhibition de la glycogène synthase (161).

De plus, de récentes données suggèrent qu'une accumulation intramusculaire de TG soit fortement reliée à la résistance à l'insuline. Les

mécanismes sous-jacents impliquent des défauts dans le métabolisme des acides gras, conduisant à une diminution de leur oxydation parallèlement à une augmentation de l'estérification et de l'entreposage triglycéridique à l'intérieur du muscle. Cette accumulation refléterait un excès d'acyl-coenzyme A à longue chaîne (LC-CoA), et des métabolites de ce dernier, tels que le diacylglycérol, les céramides et les hexosamines dont une des fonctions est d'inhiber l'action de l'insuline (152, 153, 160). En outre, la contribution des acides gras libres dans la résistance à l'insuline pourrait être expliquée par une diminution de l'accès de l'insuline aux cellules musculaires (153) ou par l'altération de la translocation des transporteurs de glucose GLUT4, probablement par un processus d'acylation des protéines impliquées dans la fusion membranaire (162). Finalement, les phénomènes relatifs au stress oxydatif détaillés plus loin représentent une autre voie reliant les acides gras libres et la résistance à l'insuline au niveau du muscle (163).

5.2 Foie

À l'état normal, l'insuline a la capacité de non seulement stimuler l'utilisation, mais également de freiner la production hépatique du glucose. Les acides gras libres interviennent dans la régulation de cette production endogène de glucose, ce qui peut avoir d'importantes répercussions sur la résistance à l'insuline et la pathogenèse du diabète de type 2. Ainsi, les effets d'une augmentation du flux d'acides gras libres vers le foie se traduisent principalement par une stimulation de la gluconéogenèse. Parmi les

mécanismes potentiels, on propose une augmentation de la production d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide-adénine dinucléotide réduit (NADH), ainsi que l'activation de la pyruvate carboxylase secondaire à une augmentation de l'oxydation des acides gras (164) et via la stimulation du système glucose-6-phosphatase (153, 165). Cette augmentation de la production de glucose par le foie peut ainsi exacerber et maintenir un état hyperglycémique déjà présent (153, 165, 166), ce qui reflète l'importance des acides gras comme déterminants de l'insulino-résistance hépatique.

Par ailleurs, un flux augmenté des acides gras vers le foie peut avoir comme conséquence une augmentation de la synthèse et sécrétion des VLDL. En effet, l'estérification des acides gras captés par le foie dépasse considérablement leur taux d'oxydation, induisant une surproduction de VLDL. À son tour, cette dernière entraîne une libération accrue des acides gras libres engendrant ainsi un cercle vicieux responsable des fortes concentrations plasmatiques de VLDL en présence d'une résistance à l'insuline (163, 167).

Finalement, dans un état insulino-résistant, l'hyperinsulinémie périphérique est causée tant par une hypersécrétion insulinique que par une élimination hépatique déficiente de l'insuline. L'élimination hépatique de l'insuline dépend étroitement de l'efficacité de la liaison à son récepteur. Puisque, tel que mentionné précédemment, la présence d'acides gras libres peut affaiblir la liaison de l'insuline à son récepteur, on observe une diminution de la clairance hépatique de l'insuline (163) et une augmentation de l'insulinémie, responsable de la régulation négative du nombre de

récepteurs dans les tissus périphériques aggravant l'insulino-résistance (158, 166).

5.3 Tissu adipeux

La relation entre l'obésité et la résistance à l'insuline est désormais très bien documentée (153). De nombreux travaux ont démontré que l'abondance de tissu adipeux et notamment dans la région abdominale peut avoir des conséquences métaboliques défavorables et est négativement reliée à la sensibilité à l'insuline, ce qui inclut l'obésité parmi les facteurs dominants caractérisant le syndrome d'insulino-résistance (106). Deux théories pourraient expliquer l'effet du tissu adipeux intrapéritonéal sur la sensibilité à l'insuline. Premièrement, cette position anatomique favorise un drainage veineux dans le système porte induisant ainsi une augmentation du flux d'acides gras vers le foie, et ce, lors d'une mobilisation excessive d'acides gras libres et de glycérol. La conséquence de ce flux élevé vers le foie se manifeste par une diminution de la sensibilité à l'insuline à ce niveau, accompagnée par une surproduction de glucose, une hypertriglycéridémie et une diminution de la dégradation de l'insuline. La deuxième hypothèse suggère que le tissu adipeux viscéral est plus actif, du point de vue métabolique, que d'autres types de tissus adipeux. En effet, on retrouve une réponse lipolytique augmentée à l'adrénaline et à la noradrénaline (due à une forte concentration de récepteurs β-adrénergiques-lipolytiques et à une

quantité réduite de récepteurs α2-antilipolytiques) et une réaction diminuée à l'action antilipolytique de l'insuline (158).

Les acides gras libérés par le tissu adipeux sont également en mesure d'aggraver un état d'insulino-résistance déjà installé. Dans ce sens, il est à préciser que le tissu adipeux est extrêmement sensible à l'insuline, et ce, en comparaison avec le muscle. Par conséquent, des changements minimes dans les concentrations plasmatiques d'insuline ont des effets considérables sur les niveaux d'acides gras libres. Donc, l'incapacité de l'insuline à supprimer la libération des acides gras est le changement primordial qui survient lorsque la sécrétion d'insuline diminue chez des sujets insulino-résistants (69).

En conclusion, le flux d'acides gras libres augmente chez le sujet obèse et résulte autant d'un apport alimentaire excessif que d'une importante masse adipeuse, accompagnée d'une insulino-résistance à ce niveau. Le cheminement de ces acides gras vers les autres organes métaboliques tels que le muscle et le foie détermine l'évolution de la physiopathologie de la résistance à l'insuline (168).

5.4 Hyperlipidémie post-prandiale et résistance à l'insuline

Le développement de l'athérosclérose est le résultat d'un processus multifactoriel dans lequel les anomalies du métabolisme des lipoprotéines constituent un élément crucial. À ce niveau, le risque athérosclérotique relié aux particules riches en TG, notamment en période post-prandiale a

longtemps été le sujet de controverse. Cependant, depuis la toute première publication en 1979 (169) mettant en relation l'athérogenèse et les perturbations post-prandiales du métabolisme des lipoprotéines riches en TG, ce phénomène, à première vue inoffensif a longuement été étudié. Les études subséquentes présentent maintenant la lipémie post-prandiale comme un facteur de risque indépendant dans le développement des maladies cardiovasculaires.

Le ralentissement du métabolisme des lipoprotéines riches en TG d'origine intestinale (les chylomicrons) et hépatique (les VLDL) en période post-prandiale entraîne une dégradation partielle de ces particules et la formation de résidus, dont l'accumulation génère un environnement proathérogène (170). Ceci est reflété par une lipémie post-prandiale prolongée, observée chez des sujets avec des maladies cardiovasculaires (171-173), des désordres lipidiques tels que l'hypertriglycéridémie (174), ainsi que dans les cas de résistance à l'insuline (175, 176), d'obésité viscérale (177-179), d'intolérance au glucose (180), de diabète de type 2 (181,182) et de syndrome de résistance à l'insuline (183). Par conséquent, la nature proathérogène de l'hyperlipidémie post-prandiale peut ainsi expliquer, du moins en partie, le risque cardiovasculaire accru observé en présence de résistance à l'insuline.

La dégradation des TG contenus dans les chylomicrons et les VLDL donne naissance à des particules plus petites, plus denses, dépourvues de leur contenu en TG, PL et apos, mais enrichies en cholestérol ester. Ces particules sont particulièrement athérogènes et prothrombogènes, étant

donné leur diffusion plus efficace dans la paroi artérielle et leur rétention accrue par les protéoglycans à l'intérieur de l'intima artérielle. Elles sont également associées à la formation de produits lipolytiques cytotoxiques pour les macrophages augmentant la perméabilité des cellules endothéliales et la production de radicaux libres de superoxyde, à la formation de molécules d'adhésion et de cellules spumeuses ainsi qu'à une activité élevée du facteur coagulant XII (184, 185). Finalement, l'hyperlipidémie post-prandiale détermine également des modifications qualitatives et quantitatives des particules LDL et HDL. Lorsque les résidus des lipoprotéines résident en circulation pendant une période prolongée, on assiste à des échanges d'esters de cholestérol et de TG entre ces résidus et les particules LDL et HDL. Ce processus résulte en un enrichissement en TG de ces dernières, sous l'action de la CETP. Par la suite, les TG contenues dans ces particules subiront une hydrolyse par la LH, ce qui donnera naissance à des particules plus petites et denses, connues pour leurs propriétés proathérogènes (170).

Cette hyperlipidémie post-prandiale trouve son origine dans la diminution de l'efficacité de l'hydrolyse lipidique associée à une surproduction concomitante de lipoprotéines par l'intestin et le foie. En ce qui a trait à la dégradation lipolytique, l'activité de la LPL est un déterminant essentiel du métabolisme postprandial des lipides. Il s'agit d'une enzyme située dans les lits capillaires des tissus périphériques responsable de l'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons et les VLDL en acides gras libres qui entreront dans la cellule. Puisque ces lipoprotéines d'origine intestinale et hépatique font face à une cascade lipolytique très semblable, elles se

retrouvent en compétition pour les mêmes sites de dégradation impliquant la LPL, ce qui retarde leur hydrolyse (177). De plus, malgré une augmentation substantielle lors de la période post-prandiale chez les sujets sains, l'activité de la LPL est significativement réduite dans la résistance à l'insuline et dans le diabète de type 2 (186). En effet, l'insuline représente un stimulant important de la LPL, ce qui explique cette synergie néfaste entre l'action de la LPL et la résistance à l'insuline (187). Finalement, l'accumulation d'acides gras à proximité de la LPL peut conduire à son inactivation et à sa dissociation du site endothélial de liaison (188).

Dans des conditions normales, les lipoprotéines riches en TG subissent des changements dans leur composition, facilitant leur captation par le foie. Toutefois, lorsqu'on assiste à des perturbations métaboliques postprandiales, leur captation est retardée, rendant ces particules davantage athérogènes. Les R-CM ou de VLDL sont catabolisés au niveau hépatique par une endocytose médiée par des récepteurs spécifiques. Les principaux récepteurs impliqués sont le récepteur des LDL, le récepteur B/E et le LRP (170) et l'activité de ce dernier est potentialisée par la LPL (177). D'autres éléments participent activement à la dégradation de ces résidus : la LH et les molécules d'héparan-sulfate protéoglycans (185). Par conséquent, la résistance à l'insuline est autant responsable d'une hydrolyse déficiente des particules riches en TG que d'une captation incomplète par le foie.

Parallèlement à une altération de la dégradation post-prandiale des lipoprotéines riches en TG, une surproduction de lipoprotéines intestinales et hépatiques observée lors de la résistance à l'insuline représente un facteur

essentiel dans le développement et le maintien d'une hypertriglycéridémie post-prandiale (189).

Tel que décrit dans la section 5.2, la résistance à l'insuline conduit vers une surproduction de VLDL par le foie. En effet, cette sécrétion hépatique dépend étroitement de la quantité d'acides gras libres disponibles. En résumé, puisque la capacité de l'insuline à freiner la libération des acides gras par le tissu adipeux est altérée, le flux vers le foie est augmenté, ce qui explique la forte production de VLDL (69, 167).

Par contre, l'influence de la résistance à l'insuline sur le transport intestinal des lipides, est moins bien connue. Toutefois, des données provenant de notre laboratoire ont permis d'observer une production accrue de lipoprotéines intestinales riches en TG en présence de résistance à l'insuline et lors d'un état diabétique. L'étude des mécanismes intracellulaires sous-jacents à cette surproduction lipidique chez les gerboises *Psammomys Obesus,* un modèle chez lequel la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont induits nutritionnellement a permis de mettre en évidence plusieurs éléments: des niveaux plasmatiques augmentés de chylomicrons et d'apo B-48 en période post-prandiale, ainsi que de TG plasmatiques et intestinaux. La culture des explants intestinaux de ces animaux nous révèle une efficacité supérieure de la synthèse *de novo* des TG et de l'apo B-48, de l'assemblage de lipoprotéines riches en TG, une augmentation des activités des monoacylglycérol et diacylglycérol acyltransférases, deux enzymes impliquées dans la formation de TG, et des niveaux élevés de la Liver fatty acid binding protein (L-FABP), un transporteur des acides gras. Dans

l'ensemble, ces données illustrent que la résistance à l'insuline et le diabète sont étroitement reliés à une surproduction de lipoprotéines intestinales riches en TG pouvant contribuer à l'hypertriglycéridémie post-prandiale (190).

La relation entre la résistance à l'insuline et la lipémie post-prandiale est pourtant réciproque. Dans ce sens, une élévation des niveaux circulants de lipides dans la période post-prandiale induit ou aggrave un état de résistance à l'insuline qui, à son tour, renforce l'hyperlipidémie post-prandiale.

Plusieurs éléments sont en mesure de prévenir l'augmentation de la lipémie postprandiale, dont l'exercice physique et les types d'acides gras ingérés. En effet, l'exercice sous la forme de marche rapide, d'une durée limitée (30 minutes), à une fréquence quotidienne, démontre des effets incontestables à court terme (191-193). En ce qui a trait aux types d'acides gras, des données provenant d'études animales et humaines révèlent que les réponses post-prandiales sont similaires pour les AGMI et AGS, mais sont plus atténuées dans le cas des AGPI, notamment ceux de la série ω-3. Ceci est partiellement dû à une épuration plus rapide des chylomicrons contenant des acides gras ω-3 ainsi qu'à une activation plus efficace de la LPL (194, 195).

5.5 Action des acides gras libres sur la sécrétion d'insuline

Les acides gras libres peuvent également influencer la sécrétion d'insuline par le pancréas. En effet, les cellules β-pancréatiques détiennent

des mécanismes adaptatifs aux concentrations de nutriments tels que les acides gras et le glucose qui lui permettent de maintenir l'homéostasie glucidique. Cependant, ces nutriments exercent des effets contradictoires, et ce, dépendamment de leur concentration ou de la durée d'exposition. De plus, les effets des acides gras sur la sécrétion insulinique deviennent particulièrement apparents lors de la présence concomitante de glucose, ce qui introduit le concept de glucolipotoxicité (196).

À court terme, l'effet simultané de ces deux substrats se traduit par une augmentation de la synthèse, de la sécrétion et de l'exocytose d'insuline par le pancréas, ainsi que par une croissance des cellules β-pancréatiques. Cependant, lors d'une exposition plus prolongée, on assiste à une décompensation des cellules β se reflétant dans la modulation de l'expression de certains gènes vers une inhibition de la sécrétion insulinique (197). En effet, les acides gras peuvent moduler la sécrétion insulinique en favorisant leur oxydation au détriment du métabolisme glucidique ou en générant des signaux cytosoliques par leur estérification, et ce, indépendamment du cycle décrit par Randle. La base biochimique de cette hypothèse a été décrite par Prentky et Corkey (Fig 2). De cette manière, les acides gras pourraient jouer un rôle important dans la réduction de la sécrétion d'insuline par les cellules β-pancréatiques, responsable du passage d'un état d'insulino-résistance à un état diabétique.

Avant de réagir avec les enzymes responsables de leur métabolisme, les acides gras doivent être convertis en une forme active. En présence d'ATP et de coenzyme A, l'acyl-CoA synthétase (ACS) catalyse cette

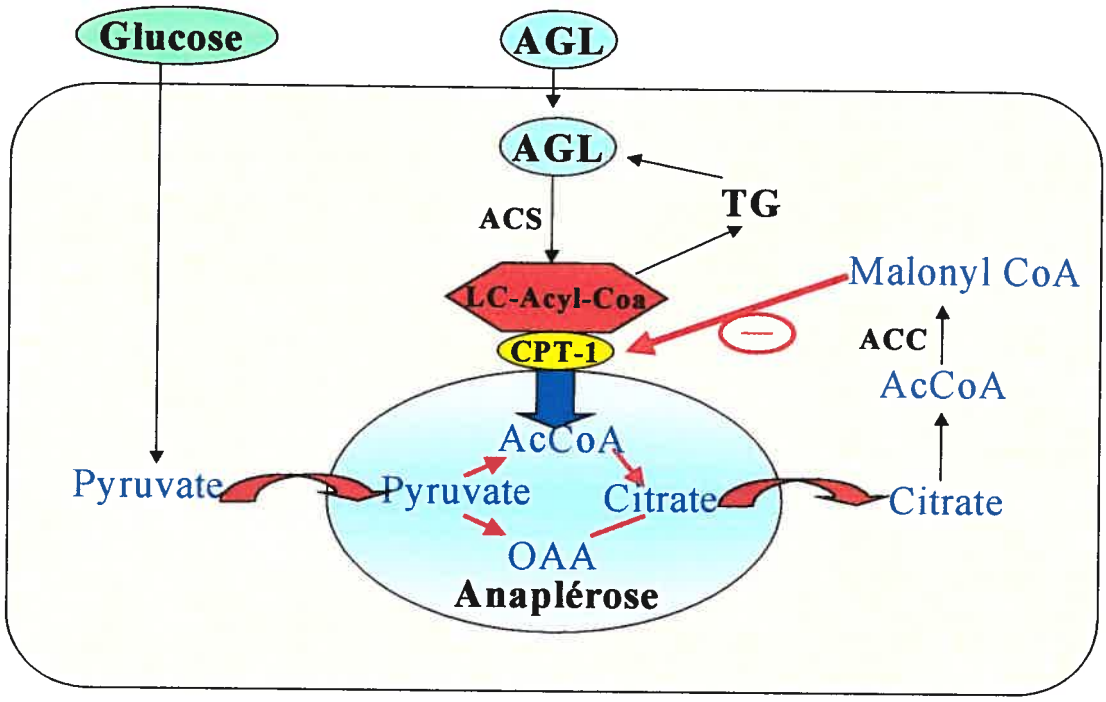
réaction, en formant un Acyl-CoA. Les Acyl-CoA à longue chaîne ou LC-Acyl-CoA nécessitent une transformation en acylcarnitines afin de pénétrer la membrane interne de la mitochondrie en vue d'une oxydation. Une enzyme, la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-1), présente dans la membrane mitochondriale externe assure cette conversion. À l'opposé, le malonyl-CoA, premier intermédiaire dans la synthèse des acides gras qui augmente suite à un repas, inhibe cette enzyme et réprime ainsi l'oxydation, tout en favorisant la lipogenèse. Lors d'un état physiologique normal, les acides gras libres entrent dans le foie par petites concentrations et sont entièrement estérifiés et sécrétés sous forme de VLDL. Par contre, lors d'un excès d'acides gras libres, tel que retrouvé à l'état de jeûne ou dans la résistance à l'insuline, ces derniers sont dirigés vers la voie de l'oxydation en inhibant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et, conséquemment, la synthèse de malonyl-CoA (199). Or, la présence concomitante de glucose vient perturber ce processus, puisqu'on assiste à une diminution de l'oxydation des acides gras en faveur d'une augmentation de la respiration. En fait, l'événement induit par la stimulation du glucose est un revirement de l'oxydation des acides gras vers celle des glucides. Ceci est possible grâce à la production de malonyl-CoA inhibant la CPT-1, enzyme-clé dans le transport de LC-CoA à travers la membrane mitochondriale, ce qui engendre une accumulation des LC-CoA dans le cytosol.

Conséquemment, la présence du glucose est essentielle à ce phénomène, puisque l'absence de malonyl-CoA dirigerait les acides gras libres vers l'oxydation mitochondriale. Cette synergie entre les apports

glucidiques et lipidiques s'explique par l'anaplérose, processus indispensable à la production de malonyl-CoA : l'efflux de citrate (précurseur du malonyl-CoA) de la mitochondrie n'aurait pas lieu sans un apport compensatoire dans le cycle de l'acide citrique (198, 200, 201).

Donc, cette voie positionne le LC-CoA en tant que molécule principale modulatrice des signaux destinés à induire la sécrétion d'insuline. En effet, il est en mesure d'augmenter la sécrétion d'insuline en stimulant directement les mécanismes sous-jacents, probablement en induisant une acylation des protéines-clé impliquées dans l'exocytose d'insuline (202). Ce processus est essentiel à la signalisation intracellulaire et implique une palmitoylation ou une myristoylation, ces deux dernières étant des liaisons covalentes entre des acides gras (palmitate ou myristate) et ces protéines, nécessaires à la modulation des fonctions protéiques (203, 204).

Figure 2 : Voies de formation des Acyl CoA à longue chaîne



(Adapté de Corkey et coll., 2000 (198).

Légende :

Les acides gras sont transformés par l'ACS en une forme active et riche en énergie : les LC-Acyl-CoA; La CPT-1 catalyse la trasformation des LC-Acyl-CoA en acylcarnitines, étape essentielle à leur transport à travers la membrane interne de la mitochondrie, en vue de l'oxydation; La présence simultanée de glucose conduit à la formation de malonyl CoA, ayant une action inhibitrice sur la CPT-1. En conséquence, en présence de glucose, on assiste à une accumulation cytosolique des LC-Acyl-CoA, responsable des effets sur la sécrétion de l'insuline.

Abréviations : ACC : Acétyl-CoA Carboxylase; AcCoA : Acétyl-CoA; ACS : Acyl-CoA synthétase; AGL : acides gras libres; LC-Acyl-CoA : Acyl-CoA à longue chaîne : CPT-1, Carnitine Palmitoyltransférase 1; OAA, Oxaloacétate; TG : Triglycérides

Après son entrée dans la cellule β, le devenir du LC-CoA est double: oxydation intra-mitochondriale et génération d'ATP ou estérification et synthèse de lipides complexes, tels que les diacylglycérols, les trialcylglycérols, l'inositol-3-phosphate et l'acide phosphatidique (200). Ces produits d'estérification sont en mesure de réguler les canaux ioniques, ou l'expression de certaines enzymes métaboliques et de stimuler directement l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline (205).

À long terme, une augmentation des niveaux de LC-CoA et de glucose diminuent la sécrétion d'insuline en modulant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus sécrétoire médié par le glucose, dans la lipogenèse, la glycolyse ou dans le métabolisme intermédiaire, et ce, dans la cellule β-pancréatique : la Fatty acid synthase (FAS), l'ACC, la glucose-6-Deshydrogénase (G-6DH) et la PKC. Plus particulièrement, les LC-CoA modifient les niveaux de deux enzymes importants: augmentent l'expression de CPT-1 et diminuent celle de l'ACC, ce qui cause une suractivation de la CPT-1, soit de manière directe ou à travers la réduction des niveaux de malonyl-CoA. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, l'insensibilité au glucose des cellules β exposées de manière prolongée à des niveaux élevés de LC-CoA.

Mis à part la voie des LC-CoA, la sécrétion d'insuline dépend du rapport ATP/Adénosine diphosphate (ADP) généré lors de la glycolyse. La production d'ATP par le métabolisme du glucose induit des changements dans l'équilibre énergétique de la cellule β en augmentant le rapport

ATP/ADP. Ceci permet la fermeture du canal potassique membranaire ATP-dépendant, la dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et provoque ainsi l'entrée de calcium dans la cellule β précédant l'insulino-sécrétion (205).

À la lumière de cette hypothèse, on peut affirmer qu'une altération profonde de la physiologie de la cellule β-pancréatique causée par les lipides pourrait expliquer les défauts insulino-sécrétoires constatés dans le diabète de type 2. Cependant, cette lipotoxicité est fortement aggravée par une glucotoxicité simultanée. Ainsi, l'hyperglycémie chronique, agissant en synergie avec une exposition prolongée à des niveaux élevés d'acides gras libres altère considérablement l'équilibre fonctionnel de la cellule β et ces défauts devraient être pris en considération lors de l'élaboration de stratégies pharmacologiques ou nutritionnelles visant à contrôler, conjointement, les niveaux plasmatiques de glucose et de lipides.

5.6 Action des acides gras sur la cellule β-pancréatique - anomalies fonctionnelles

La capacité de produire de l'insuline rend la cellule β-pancréatique unique en son genre. Cette expression de l'insuline est une conséquence de la régulation de la transcription du gène de l'insuline initiée par des facteurs transcriptionnels, mais aussi de la plasticité du pancréas. Cette dernière peut être définie comme la capacité d'adapter la masse des cellules pancréatiques

aux demandes d'insuline nécessaire au maintien de l'homéostasie du glucose. La masse totale de ces cellules est modulée par un équilibre constant entre la croissance et la mort cellulaires et tout dérangement à ce niveau peut perturber l'adaptation de la sécrétion insulinique à de fortes demandes comme celles retrouvées dans la résistance à l'insuline. En effet, il a été démontré que la diminution de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2 pouvait être expliquée en partie par une réduction du nombre absolu de cellules β. La détérioration de la cellule β-pancréatique est un processus évolutif qui, peu importe la nature du défaut initial, s'aggrave avec le temps pour aboutir à une décompensation responsable de l'état diabétique (206). Plusieurs facteurs affectant l'intégrité cellulaire, particulièrement par l'induction du processus apoptotique ont été mis en évidence (207), mais cette section ne portera que sur les acides gras, les cytokines telles que celles sécrétées par le tissu adipeux et le stress oxydatif.

Tout d'abord, outre les effets sur la sécrétion insulinique, l'accumulation de TG dans les cellules bêta du pancréas est également responsable d'une augmentation de la quantité de céramide dérivée soit de la dégradation de la sphingomyéline soit par la condensation du LC-Acyl-CoA et de la sphingamine, une réaction catalysée par la céramide-synthase (208). Il a été démontré que la céramide induit l'apoptose en activant le facteur de transcription nucléaire κB (NFκB) qui stimule l'expression de la Nitric oxyde synthase inductible (iNOS) et augmente la production d'oxyde nitrique (ON) (209). Il est connu que de fortes concentrations d'ON causent la nécrose au niveau des cellules β-pancréatiques (210). Mis à part la production de

céramide, on suggère également un effet positif direct des acides gras libres sur l'expression de la iNOS (208, 211). L'ON est un gaz synthétisé à partir de la L-arginine, lors d'une réaction catalysée par la Nitric oxyde synthase (NOS). L'attribut de radical libre confère à cette molécule la capacité de moduler un nombre considérable de fonctions biologiques telles que l'inflammation et l'immunité. Par contre, les effets de l'ON peuvent parfois paraître contradictoires. Ainsi, dépendamment des niveaux de production et du micro-environnement chimique cellulaire, comme la présence de superoxydes, l'ON peut avoir des effets bénéfiques ou nocifs. En effet, lors d'une situation physiologique normale, l'ON peut induire la vasodilatation et diminuer le stress oxydatif ou l'inflammation. Toutefois, la présence de quantités équivalentes de superoxydes et d'ON donne naissance aux peroxynitrites responsables de nombreux dommages cellulaires. Ces derniers ont la capacité d'induire l'apoptose en endommageant l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la membrane mitochondriale. Neanmoins, la susceptibilité d'une cellule à s'orienter vers l'apoptose suite à l'action des peroxynitrites dépend du bagage antioxydant dont elle dispose (212). La cellule β – pancréatique est particulièrement sensible aux radicaux libres, puisque son potentiel antioxydant représenté en partie par la superoxyde dismutase, la glutathione peroxidase et la catalase est réduit (213).

D'autre part, parmi les effets pro-inflammatoires de l'ON, on peut mentionner la médiation des signaux émis par les cytokines, processus menant à la destruction cellulaire. D'ailleurs la capacité de l'ON à médier les effets nocifs des cytokines, telles que l'IL-1β, le TNF-α et l'interféron γ (IFN-γ)

et de causer la mort cellulaire a été démontré dans les cellules bêta du pancréas. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse que le TNF-α et la leptine, deux cytokines importantes dont les niveaux augmentent dans un état d'obésité, pourraient de cette manière porter atteinte à l'intégrité de la cellule β-pancréatique. En conclusion, l'ensemble de ces données démontrent que l'ON est un important signal de mort cellulaire induit, d'une part par les acides gras et d'autre part, par les cytokines (214).

Le stress oxydatif est un concept de plus en plus redouté et étudié par la communauté scientifique et désigne un déséquilibre entre les composés pro-oxydants et la capacité antioxydante cellulaire en faveur d'un état oxydatif prononcé. Ces composés pro-oxydants sont représentés par des espèces réactives de l'oxygène qui incluent les radicaux libres tels que l'anion superoxide et des analogues organiques comme les espèces réactives d'azote. Ces espèces instables affectent plusieurs molécules biologiques comme l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides, ce qui entraîne des mutations ou l'apoptose, une perte des propriétés membranaires suite à la lipoperoxydation des lipides et une perte de flexibilité et un vieillissement prématuré de protéines telles que le collagène et la matrice extracellulaire (215). Le stress oxydatif devient ainsi le dénominateur commun de plusieurs maladies telles que le cancer, l'athérosclérose, le diabète de type 2, l'arthrite, les maladies inflammatoires de l'intestin et la maladie d'Alzheimer, pour ne nommer que celles-ci (216). Les espèces réactives de l'oxygène proviennent de plusieurs sources : une oxygénation excessive comme dans l'administration thérapeutique d'oxygène, une exposition aux ondes

ultraviolettes, aux radiations ou aux toxines et des réactions inflammatoires (215). Toutefois, des processus physiologiques tels que la respiration cellulaire constituent également une source importante d'espèces réactives d'oxygène. La phosphorylation oxydative ou le système permettant le couplage de la respiration et de la génération d'ATP est essentielle à la captation d'une grande quantité d'énergie libre provenant des substrats respiratoires. Ainsi, pratiquement toute l'énergie provenant des substrats tels que les acides gras est libérée dans la mitochondrie sous forme d'H- ou d'électrons. Ces derniers sont dirigés vers l'oxygène pour la formation d'eau, et ce, à travers la chaîne respiratoire et de manière graduelle. Un autre élément essentiel à l'oxydation via la chaîne respiratoire est la phosphorylation de l'ADP, une molécule en mesure d'emmagasiner une partie de l'énergie libre, sous forme de phosphate à haute énergie, ce qui permet la formation d'ATP. La disponibilité de l'ADP est donc indispensable à la respiration au niveau des mitochondries. Ainsi, lorsque la concentration d'ADP diminue, on assiste à un ralentissement de la phosphorylation et une accumulation d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire (217,218). Ce processus augmente les chances d'un transfert accidentel d'un électron à l'oxygène, ce qui le convertit en anion superoxyde (219). Par ailleurs, ces radicaux libres superoxides peuvent être convertis en d'autres molécules d'oxygène ou de nitrogène réactives, telles que les ions hydroxyl ou l'ON (220, 221). Généralement, un système d'antioxydants efficace est en mesure de neutraliser ces radicaux libres. Toutefois, lorsque la défense antioxydante

ne peut plus offrir une réponse compensatoire efficace capable de rétablir l'équilibre oxydatif, on assiste à l'apparition du stress oxydatif (222).

L'accumulation excessive de radicaux libres induit de nombreuses voies de signalisation (221, 223). La première est celle du NF-κB, un facteur de transcription jouant un rôle critique dans la réponse immunitaire et inflammatoire ainsi que dans l'apoptose. Une fois le NF-κB activé par l'Inhibitor of kappaB kinase (IκK), il régule l'expression d'un large éventail de gènes, incluant des facteurs de croissance, des cytokines proinflammatoires et des molécules d'adhésion (224, 225). L'activation du NF-κB est régulée par la phosphorylation du Inhibitor of kappaB (IκB), une sous-unité inhibitrice attachée au NF-κB dans le cytoplasme (221). Elle se traduit par la libération du NF-κB, suivie par sa migration vers le noyau. La phosphorylation du IκB est modulée par l'enzyme IκK, un complexe hétérotrimérique constitué de deux sous-unités catalytiques, IκKα (ou IκK1) et IκKβ (ou IκK2) et d'une unité régulatrice (IκKγ).

Une augmentation de l'activité du IκKβ dans le muscle résistant à l'insuline (226) et une inhibition de l'action de l'insuline lors de l'activation du IκKβ (227) ont été constatées, ce qui suggère un effet direct de la voie impliquant le NF-κB sur la résistance à l'insuline. Deux autres voies faisant partie de la famille des Mitogen-activated protein (MAP) sérine/thréonine protéines kinases sont activées par le stress oxydatif, soient celles des c-Jun N-terminal kinase (JNK)/Stress-activated protein kinase (SAPK) et des MAPkinase p38 (p38 MAPKs). Le premier est un médiateur connu de

l'apoptose (228) et le deuxième influence un grand nombre de processus cellulaires parmi lesquels on peut citer l'inflammation, la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et l'apoptose (229). En outre, l'activation de nombreuses cascades sérine/kinases par le stress oxydatif intervient dans les voies de signalisation de l'insuline, et ce, à plusieurs niveaux, incluant le récepteur à l'insuline et le substrat de ce récepteur, provoquant ainsi une altération de l'action de l'insuline (230).

Dans ce contexte d'association entre le stress oxydatif d'une part et les complications reliées au diabète ou la résistance à l'insuline d'autre part, les acides gras libres interviennent de manière directe ou indirecte. Tout d'abord, ils sont en mesure de causer un stress oxydatif à travers un découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie, suite à une déficience intramitochondriale en ADP, accompagnée par une forte production de radicaux libres (217, 231). Deuxièmement, les acides gras libres ont la capacité d'influencer directement la voie impliquant le NF-κB (221, 223).

Mis à part ces effets systémiques, le stress oxydatif inflige également des dommages au niveau de la cellule β-pancréatique (221, 232) qui est particulièrement sensible étant donné son faible potentiel antioxydant. En effet, elle sont appauvries en (Cuivre/Zinc) CuZn superoxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase (233). On suggère que le processus apoptotique dans ces cellules est étroitement relié à l'activation de NF-κB, de JNK/SAPK et de la présence d'ON (225, 228).

Ces principes obtenus majoritairement lors de travaux *in vitro* ont été

confirmés dans le cadre d'études cliniques. En effet, on a révélé que le stress oxydatif induit par les acides gras libres était en mesure de contribuer à la dysfonction endothéliale (234-236), la résistance à l'insuline (236, 237) et participer dans la pathogenèse des complications cardiovasculaires reliées au syndrome de résistance à l'insuline (238, 239) et du diabète de type 2 (240).

5.7 Effets des différents types d'acides gras sur la sensibilité à l'insuline

La composition exacte d'une diète visant la prévention ou le traitement du syndrome métabolique ou du diabète de type 2 reste encore à déterminer. Toutefois il est bien établi qu'une diète riche en matières grasses est associée à une sensibilité à l'insuline atténuée et un risque accru de développer un diabète de type 2. Cette association est indépendante de l'obésité et de la distribution du tissu adipeux, mais semble plutôt être reliée aux types d'acides gras ingérés (158, 241). Il est à noter qu'actuellement les méthodes servant à estimer, chez l'humain, la teneur en nutriments d'une diète donnée sont à améliorer. Il est bien connu que les relevés alimentaires peuvent sous-estimer la consommation de certains nutriments, notamment des matières grasses, et ce, au sein de groupes particuliers, dont les sujets obèses. Pour remplacer ce procédé, les chercheurs ont fait appel au dosage des lipides sériques ainsi qu'à la détermination de la composition en acides gras des PL membranaires du muscle squelettique, puisque la qualité des

lipides dans la diète consommée au cours des dernières semaines est reflétée dans la composition de ces acides gras. Ceci a permis de constater qu'une baisse de la sensibilité à l'insuline était reliée à de fortes proportions d'AGS (242, 243) et à une quantité réduite d'AGPI dont l'acide linoléique ou les acides gras de la série ω-3 (155). Une modification dans la composition des acides gras présents dans les membranes cellulaires peut influencer leurs propriétés physico-chimiques et ainsi affecter l'effet médié par l'insuline en raison de l'altération de la fonction du récepteur en ce qui a trait à l'affinité et la liaison. Ces altérations conduisent à la diminution de la translocation des transporteurs de glucose et à la réduction de la perméabilité ionique (155, 241, 244). De plus, les AGPI sont davantage utilisés en tant que substrat énergétique comparativement aux AGS. Ces derniers sont entreposés dans le tissu adipeux avec plus d'efficacité et leur mobilisation est plutôt amoindrie lors d'un stimulus lipolytique. En fait, la mobilisation des dépôts lipidiques est proportionnelle au degré d'insaturation de la chaîne carbonée. Par ailleurs, ces deux types d'acides gras ont des actions opposées en ce qui a trait à l'expression génique d'enzymes impliquées dans la synthèse endogène de lipides ou dans la prolifération adipocytaire : les AGS affichant une stimulation et les AGPI, une inhibition. Au niveau du pancréas, les AGS provoquent une hypersécrétion d'insuline (244). D'autres fonctions peuvent être attribuées aux AGPI : la stimulation de l'oxydation (245), l'augmentation de la thermogenèse, l'induction d'enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras, telles que la CPT-1 et l'acyl CoA oxydase, la suppression de la lipogenèse hépatique et de la sécrétion de TG par le

foie, ainsi que l'élévation de la fluidité membranaire facilitant la liaison de l'insuline à son récepteur. Tous ces processus sont accompagnés par une diminution de l'accumulation de tissu adipeux et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (246). Les AGPI agissent sur l'expression de certains gènes par l'intermédiaire des facteurs de transcription tels que les Peroxysome proliferator activated receptors (PPAR) α et γ. Les PPAR appartiennent à la super-famille des récepteurs nucléaires hormonaux de type stéroïdien et c'est par l'intermédiaire de ces récepteurs que les acides gras peuvent induire une vaste gamme de réponses géniques et cellulaires (247) (Tableau V).

Tableau V: Enzymes ou autres éléments modulés par les acides gras polyinsaturés (ω-3 et ω-6)

Enzymes ou autres éléments impliqués dans l'oxydation des acides gras
↑ Carnitine palmitoyltransférase
↑ Acyl Co-A oxidase
↑ 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase mitochondriale
↑ Acyl-CoA oxidase
↑ Fatty Acid Binding Proteins
Enzymes ou autres éléments impliqués dans la synthèse endogène de lipides
↓ Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 (SREBP-1)
↓ Facteur nucléaire γ
↓ Gène Sp1
↓ De la concentration nucléaire et de l'affinité d'interaction avec l'ADN des facteurs nucléaires responsables de la lipogenèse (ex : Facteur nucléaire hépatique-4 (HNF-4))
↓ Acide gras synthase
↓ Glucokinase hépatique
↓ Pyruvate kinase
↓ Pyruvate deshydrogénase
↓ Acétyl-CoA carboxylase

Adapté de Clarke (245, 246)

Légende : ↑ Induction; ↓ Inhibition;

Quant aux huiles de poisson, riches en AGPI de la série ω-3 (acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque), ils sont en mesure de réduire le contenu intramusculaire en TG suite à une induction de l'oxydation de ces

acides gras (246). L'ensemble de ces données démontre que les AGPI de la série n-6, mais surtout ceux de la série n-3, jouent un rôle important dans la prévention de la résistance à l'insuline, en régulant le métabolisme glucidique et lipidique. Ils devraient donc être considérés comme des facteurs nutritionnels ayant le potentiel d'améliorer la sensibilité à l'insuline et devraient faire partie d'un plan intervention thérapeutique (248). Cependant, très peu d'études épidémiologiques ont examiné le rôle des acides gras en tant que bio-marqueurs de la résistance à l'insuline ou du diabète de type 2. Malgré les faits favorables recueillis lors d'études animales, la controverse persiste en ce qui concerne les données obtenues lors d'interventions humaines. En effet, tel que présenté dans le tableau VI, certaines investigations démontrent que des modifications diététiques dans les types d'acides gras ne sont aucunement associées à la sensibilité à l'insuline tandis que d'autres suggèrent une relation très étroite. De la même manière, une supplémentation en acides gras ω-3 chez des sujets diabétiques (249-251) ou sains (252), ne semble pas influencer la sensibilité à l'insuline même si des études ont montré qu'une proportion élevée d'acides gras à chaîne longue de la série ω-3 dans les PL membranaires du muscle squelettique était associée à une élévation de la sensibilité à l'insuline. Par contre, de nombreuses enquêtes révèlent une association positive entre une forte consommation d'AGS et une sensibilité à l'insuline réduite (155, 243, 253-256), ainsi qu'une corrélation négative entre un apport élevé de matières grasses végétales et le risque du diabète de type 2.

En ce qui concerne la consommation d'AGMI, certaines études

épidémiologiques lui attribuent une association inverse par rapport au risque de diabète de type 2 ou la résistance à l'insuline (257). Toutefois, des évidences révélant une corrélation positive entre ces deux facteurs sont également disponibles dans la littérature (252, 258). Cependant, connaissant les vertus de la diète Méditéranéene caractérisée par une forte teneur en AGMI, notamment en acide oléique qui se manifestent également par une faible prévalence des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2, on favorise donc un apport modéré d'AGMI pour améliorer la sensibilité à l'insuline (592).

Rares sont par contre les rapports sur l'effet des acides gras *trans* sur le métabolisme glucidique, mais des données préliminaires suggèrent une augmentation du risque de diabète de type 2 associée à leur consommation (253, 259-261). Les effets des AGPI de la série ω-6 n'ont pas encore été étudiés au sein de larges enquêtes épidémiologiques d'intervention. Toutefois, leurs effets laissent présager une amélioration de la sensibilité à l'insuline (255, 257, 260, 262).

La dernière classe d'acide gras affichant une association avec la résistance à l'insuline est celle des acides linoléiques conjugués (ALC). Il s'agit d'un groupe d'isomères de l'acide linoléique, naturellement présents dans les viandes de ruminants, comme le bœuf et le mouton, ainsi que dans les produits laitiers provenant de ces animaux. De nombreuses études ont révélé des effets métaboliques importants des ALC, comme la réduction de la masse adipeuse (263-265), l'inhibition de la carcinogenèse (266-269), la réduction des plaques athérosclérotiques (270) et le contrôle de la sensibilité

à l'insuline (265, 271). Malgré ces résultats prometteurs, l'impact des ALC demeure encore controversé chez l'humain. Ceci n'a pourtant pas freiné l'utilisation de suppléments à base d'ALC en tant qu'agents destinés à promouvoir une perte de poids. Les formules commerciales sont des mélanges d'isomères, contenant majoritairement deux isomères, en quantités égales : *t*10*c*12 et *c*9*t*11, ce dernier étant le plus prévalent dans la diète (272). De récentes études ont démontré qu'un mélange d'ALC, tel que les suppléments disponibles sur le marché ne sont pas en mesure d'affecter la sensibilité à l'insuline (273-275) contrairement aux isomères *t*10*c*12 qui ont entraîné une augmentation de la résistance à l'insuline, suggérant un effet diabétogène spécifique à cet isomère (273). Le mécanisme par lequel la supplémentation en *t*10*c*12 exerce cet effet serait par l'induction du stress oxydatif, un processus étroitement relié à la résistance à l'insuline, tel que démontré précédemment (276).

Pour le moment, on ne dispose pas de recommandations nutritionnelles clairement établies en ce qui a trait à la composition lipidique d'une diète destinée à prévenir ou à traiter la résistance à l'insuline. Cependant, des lignes directrices globales suggèrent de limiter l'apport en lipides et surtout en AGS ou *trans* et de favoriser la consommation d'une diète riche en AGMI et en AGPI, notamemnt de la série ω-3 (593).

Tableau VI : Effets des différentes classes d'acides gras sur la sensibilité à l'insuline

Sujets	Nb	Type d'acide gras	Effet	Réf.
Acides gras de la série ω-3				
DB II avec hypertriglycéridémie	16	Huiles de poisson	=	251
DB II	10	Huiles de poisson	=	249
DB II	8	Huiles de poisson	=	250
Sujets sains	162	Huiles de poisson	=	252
Acides gras saturés				
F. obèses F. de poids normal	7 8	Huile de palme, saindoux et shortening	= =	253
Sujets normaux	600		↓	243
H. âgés de 70 ans	215	AGS présents dans les membranes cellulaires	↓	254
Sujets normaux et DB II	24 53	AGS présents dans les phospholipides plasmatiques	↓ =	255
H. normoglycémiques	895	AGS sériques	↑ de l'incidence d'hyperglycémie à jeun ou de DB II	256
Acides gras monoinsaturés				
Sujets sains	162	Substitution des AGS alimentaires par des AGMI	↑	252
Sujets sains	59	Substitution d'une diète riche en AGS par une diète de type Méditerranéene, riche en AGMI	↑	258
Sujets sains, IGT, DB II	1173	Supplémentation en acide oléique	↓	257

Acides gras polyinsaturés (ω-6)				
Sujets sains, IGT et DB II	1173	Supplémentation en a.g. ω-6	↑	257
H	40	ω-6 dans les phospholipides du muscle squelettique	↑	262
Sujets normaux et DB II	24 53	a.g. ω-6 dans les phospholipides plasmatiques	↑ (effet observé chez les sujets sains)	255
Acides gras trans				
Sujets sains, IGT et DBII	38	Apport alimentaire en a.g. *trans*	=	261
F obèses et de poids normal	7 8	Apport alimentaire en a.g. *trans*	=	253
Acides linoléiques conjugués				
H avec une obésité abdominale	60	- ALC (mélange d'isomères) - Isomère *t*10*c*12 purifié	= ↓	273
H obèses	25	ALC (mélange d'isomères)	=	274

Légende :

↑ : augmente; ↓ : diminue; = : pas de changement; A.G. : acides gras; H : Hommes; F : Femmes; DB II : Diabétiques de type 2; IGT : Intolérance au glucose

5.8 Rôle de l'adipocyte dans la résistance à l'insuline

Comme nous le verrons au cours de cette section, la production adipocytaire d'effecteurs autres que les acides gras non estérifiés peut considérablement influencer la résistance à l'insuline. Jusqu'à récemment, le

tissu adipeux était considéré un simple site d'entreposage de TG sous la forme de gouttelettes lipidiques. Cependant, les récentes études ont démontré que le tissu adipeux participe activement dans la régulation des fonctions cellulaires au niveau de plusieurs tissus en se servant d'un réseau complexe de signaux endocrines, paracrines et autocrines (154). Ces derniers visent plusieurs organes, tels que l'hypothalamus, le foie, le muscle et le pancréas. Ainsi, une vaste gamme de signaux déterminant la sensibilité à l'insuline émane de l'adipocyte par la synthèse d'adipokines : l'adipsine, l'angiotensinogène, la FABP adipocytaire, le PAI-1, TNF-α, la leptine, l'IL-6, la résistine, l'adiponectine, pour ne citer que ceux-ci. Une discussion détaillée portera sur ces cinq derniers uniquement, étant donné leur rôle dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. L'obésité résulte de changements dans la structure du tissu adipeux, autant quantitatifs que qualitatifs et ces phénomènes pourraient exacerber la production de cytokines adipocytaires ainsi que leurs actions locales ou systémiques, ce qui pourrait consolider les complications pathophysiologiques reliées à une augmentation de la masse adipeuse (168).

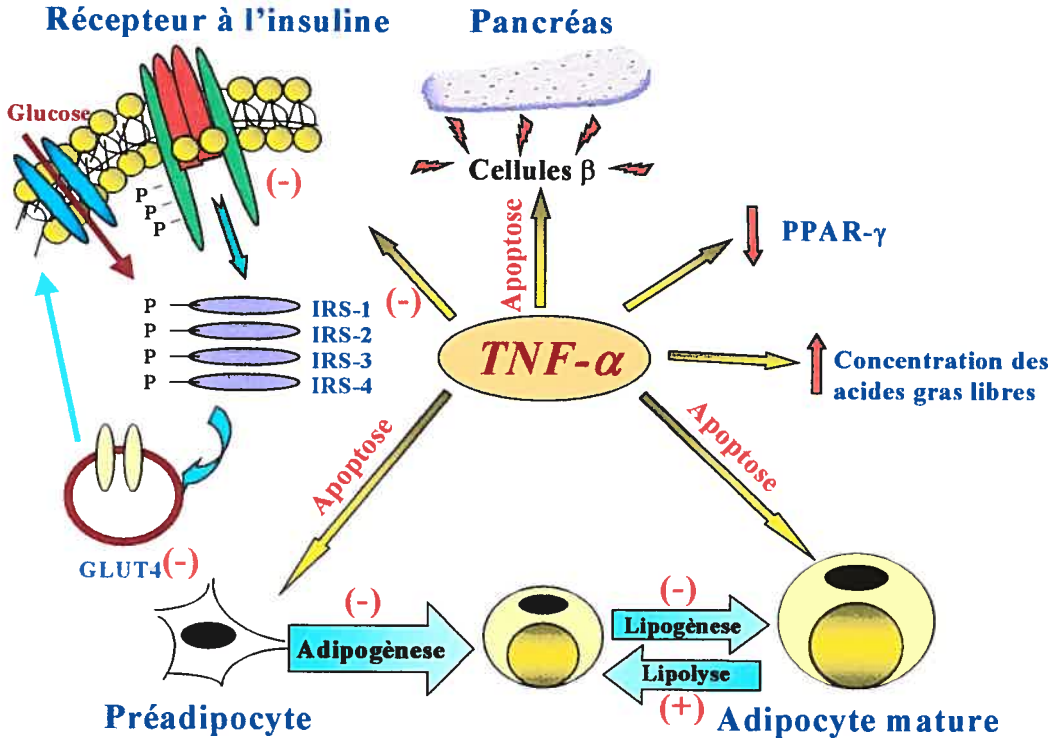
Le TNF- α est une cytokine d'abord identifiée en tant que produit des macrophages impliquée dans les désordres métaboliques reliés à l'inflammation et à la carcinogenèse. Toutefois, depuis les dix dernières années, cette cytokine reçoit une attention particulière, en raison de sa capacité de contrôler la masse adipeuse. Les changements à ce niveau surviennent de deux sources : le nombre d'adipocytes, influencé par

l'adipogenèse ou la transformation des préadipocytes en adipocytes. Cette transformation est contrôlée par la réplication des préadipocytes ou par l'apoptose des cellules adipocytaires d'une part et le volume adipocytaire, régi par la captation des acides gras, la lipogenèse et la lipolyse d'autre part. Il a été démontré que le TNF-α intervient à plusieurs niveaux : en inhibant l'adipogenèse (278), en induisant l'apoptose autant des préadipocytes que des adipocytes (279) et en orientant le métabolisme vers une diminution de l'accumulation des lipides dans l'adipocyte via la libération d'acides gras. Ce dernier effet résulte de l'inhibition de l'activité de la LPL, enzyme permettant l'entrée des acides gras (280) et de l'induction de la lipolyse par neutralisation de la lipase hormono-sensible (281).

Mis à part les effets décrits ci-haut, le TNF-α est un facteur important associé au développement de la résistance à l'insuline. Tel que présenté dans la figure 3, plusieurs autres mécanismes expliquent la contribution du TNF- α à ce niveau. Premièrement, cette cytokine intervient dans la cascade de signalisation intracellulaire du récepteur à l'insuline, notamment en diminuant la phosphorylation du résidu tyrosine et l'expression des protéines impliquées dans l'action de l'insuline telles que l'Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) et GLUT4 (282). En outre, il agit à travers le maintien d'une forte concentration d'acides gras libres et une régulation négative des PPAR-γ, un important récepteur nucléaire favorisant la sensibilité à l'insuline (283). Finalement, le TNF- α agit de manière directe sur la cellule β-pancréatique en induisant son apoptose (154). Une élévation de l'expression du TNF-α dans

les adipocytes en présence d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète de type 2 a été confirmée dans le cadre de plusieurs études cliniques (284, 285, 286).

Figure 3 : Mécanismes reliant le TNF-α à la résistance à l'insuline :



Légende:

Le TNF-α participe à l'induction d'un état de résistance à l'insuline en intervenant dans la cascade de signalisation intracellulaire du récepteur à l'insuline et dans l'expression des protéines impliquées dans l'action de l'insuline telles que l'IRS-1 et GLUT4, en agissant à travers le maintien d'une forte concentration d'acides gras libres et par une régulation négative des PPAR-γ. De plus, il agit de manière directe sur la cellule β-pancréatique en induisant son apoptose et sur l'adipocyte, en modulant l'adipogenèse ou la transformation des pré-adipocytes en adipocytes matures. Abréviations : GLUT-1 : Glucose transporter-4; IRS-1 : Insulin receptor substrate-1; PPAR : Peroxysome proliferator activated receptor; TNF-α : Tumor necrosis factor- α.

Une autre cytokine produite par le tissu adipeux responsable de la modulation de la sensibilité à l'insuline est la leptine. Il s'agit du produit du gène *ob* et son rôle fondamental est d'informer l'hypothalamus des réserves adipeuses corporelles et d'intervenir dans le contrôle de l'appétit et du poids corporel. La synthèse de la leptine est stimulée par les infections, les endotoxines et les cytokines telles que le TNF-α. Les niveaux sériques de leptine présentent également des variations en fonction de l'âge et du sexe. Chez l'humain, les niveaux de leptine augmentent progressivement durant l'enfance, pour atteindre un point culminant peu avant la puberté et demeurent relativement constants au-delà de l'âge de 20 ans. La différence entre les sexes ne se manifeste pas lors de la période pré-pubertaire, mais apparaît à l'âge adulte. Cette différence dénote des concentrations plasmatiques plus élevées chez les femmes que chez les hommes, pour laquelle une explication robuste n'est pas encore disponible (594, 595).

Mis à part ces fonctions métaboliques spécifiques, la leptine est également impliquée dans l'induction de la résistance à l'insuline ou la progression vers un diabète de type 2, via des modifications dans la cascade de signalisation du récepteur à l'insuline et en diminuant la production d'insuline par la cellule β-pancréatique. Puisque la quantité de leptine reflète une masse adipeuse importante, elle-même reliée à une résistance à l'insuline, on peut supposer que ces deux hormones sont interreliées. La présence de récepteurs à la leptine de type B (Ob-Rb) dans les cellules δ et β-pancréatiques vient confirmer cette hypothèse (287). L'effet de la leptine

sur la sécrétion d'insuline varie considérablement, mais la majorité des études suggèrent une action inhibitrice. Cette dernière est exercée à différents niveaux intracellulaires, de la transcription jusqu'à la perméabilité membranaire (288, 289). Il est à préciser que cet effet hypo-insulinémiant vise la sécrétion basale d'insuline, mais également celle induite par le glucose, son rôle physiologique étant de contrôler l'hypersécrétion postprandiale (290, 291). Par ailleurs, la présence de récepteurs à la leptine dans les tissus insulino-sensibles suggère que la leptine peut moduler leur réponse insulinique (289).

Une corrélation positive entre les niveaux de leptine et d'insulinémie à jeun ou la résistance à l'insuline a été rapportée chez des adultes ou enfants en santé, des sujets obèses ou diabétiques, ainsi que chez des femmes ménopausées, et ce, indépendamment de la masse adipeuse (288). Ceci conduit à l'hypothèse qu'une hyperleptinémie, telle que celle constatée dans l'obésité serait responsable d'une désensibilisation des récepteurs à la leptine dans le pancréas et conduirait à une hyperinsulinémie chronique contribuant à la résistance à l'insuline ou au diabète de type 2 (289). Toutefois, plusieurs études sont nécessaires afin de bien définir le rôle de la leptine dans le sécrétion et l'action de l'insuline, étant donné les divergences entourant l'interaction entre ces deux hormones (154).

En ce qui a trait à la résistine, l'article publié par Steppen *et coll.* dans Nature (292) a suscité un immense enthousiasme au sein de la communauté scientifique intéressée par la pathogenèse et le traitement du diabète de type 2. Cependant, il existe un nombre suffisant d'arguments nous indiquant qu'il

faut faire preuve de prudence vis-à-vis de cette nouvelle protéine en ce qui concerne ses propriétés reliées à la résistance à l'insuline. La découverte de la résistine a eu lieu lors d'investigations portant sur des gènes induits lors de la différentiation adipocytaire, mais supprimés lors de l'administration de thiazolidinédiones (TZD) (rosiglitazone et pioglitazone), des médicaments anti-diabétiques dont le rôle est d'augmenter la sensibilité à l'insuline en agissant en tant que ligand des PPAR-γ (292). Ainsi, dans les cellules 3T3-L1, une lignée fréquemment utilisée en tant que modèle pour étudier la captation du glucose stimulée par l'insuline, les TZD ont été en mesure de réduire l'expression de la résistine, ce qui suggère qu'il s'agit d'un facteur important dans l'induction de la résistance à l'insuline par l'obésité.

Chez la souris, la résistine est retrouvée en circulation et son niveau augmente considérablement dans l'obésité, autant de nature génétique qu'induite par une diète riche en matières grasses. En contrepartie, sa concentration est réduite lors d'un état de jeûne. L'administration de résistine affecte la tolérance au glucose et l'action de l'insuline, et sa neutralisation par un anticorps spécifique rétablit ces paramètres. L'évaluation de l'expression génique de la résistine chez la souris a révélé la présence exclusive d'ARNm dans le tissu adipeux, notamment dans le tissu adipeux blanc. L'ensemble de ces données suggèrent que la résistine constitue une hormone issue de l'adipocyte dont les effets sur le métabolisme glucidique s'opposent à ceux de l'insuline et représente donc un candidat intéressant pour expliquer, du moins en partie, l'action anti-diabétique des TZD et l'association entre un excès d'adiposité et la résistance à l'insuline (292, 293).

L'analyse de la séquence de la résistine a révélé qu'il s'agit d'un facteur sécrété spécifiquement par le tissu adipeux, riche en cystéine (ADSF) (294) ou d'un membre d'une famille de protéines exprimées de manière spécifique et qui ont des caractéristiques communes : Resistine-like molecule (RELM). De manière étonnante, la séquence d'acides aminés de la résistine est identique à une autre famille de protéines riches en cystéine appelées Found in inflammatory zone (FIZZ) et on propose que ces classes de protéines soient impliquées dans les processus inflammatoires associés à l'obésité (295-297). De plus, le Comité International de la Nomenclature Génétique Standardisée a réservé pour le gène codant pour la résistine/FIZZ3/ADSF l'appellation « Retn » : « Retn-1α » à celui qui code pour RELM-α/FIZZ1 et «Retn-1β » pour celui correspondant à RELM-β/FIZZ2. Chez l'humain, un homologue de la résistine a été identifié et il est produit par un gène situé sur le chromosome 19. Le taux d'homologie de sa structure protéique est de 59% par rapport à la résistine murine. De plus, son expression adipocytaire est inférieure à celle de la souris. À l'échelle génomique, de nombreuses différences ont été identifiées entre les deux espèces. Il est donc probable que la résistine humaine diffère de la résistine murine, non seulement en vue de sa structure, mais aussi à cause de sa fonction respective (293, 298). Les études humaines disponibles jusqu'à présent sont réparties en deux catégories : génétiques (visant l'analyse de l'association entre le locus correspondant à la résistine et le diabète ou l'obésité) et d'expression (portant sur la mesure de la protéine ou du ARNm en présence de ces deux pathologies) (299). De manière globale, on relève

une faible expression de la résistine dans les adipocytes et dans les cellules mononucléaires (300, 301) et on n'a pas été en mesure d'établir une association entre l'expression génique de la résistine et la sensibilité à l'insuline (300, 302). Cependant, parmi les études investiguant la possibilité d'une susceptibilité accrue au diabète et à l'obésité reliée au locus correspondant à la résistine humaine, un certain nombre ont réussi à mettre en évidence des changements dans la sensibilité à l'insuline reliées au gène de la résistine (303-306).

Malgré ces premières données ayant suscité un si grand intérêt, les effets des TZD sur l'expression génique de la résistine ainsi que le rôle de la résistine dans la résistance à l'insuline demeurent controversés. En effet, Way *et coll.* (307) ont démontré que l'expression de la résistine est significativement diminuée dans le tissu adipeux provenant de plusieurs modèles d'obésité, incluant les souris déficientes en leptine (ob/ob), déficientes en récepteur pour la leptine (db/db), porteuses d'une mutation sur le gène TUB (tub/tub) ou souffrant d'un diabète d'origine polygénique (KKA^y). De plus, leurs travaux révèlent qu'en réponse à différents agonistes des PPARγ, une expression élevée de la résistine a été remarquée dans le tissu adipeux, et ce, chez les souris ob/ob ou les rats Zucker, deux modèles de diabète de type 2.

Ces données tout à fait récentes ont refroidi la frénésie initiale conférant à la résistine un rôle essentiel dans l'établissement d'un lien entre l'obésité et la résistance à l'insuline ou le diabète de type 2. Nous disposons de très peu d'informations concernant la régulation de l'expression de la

résistine dans le tissu adipeux, mais quelques facteurs régulateurs ont pu malgré tout être mis en évidence: l'obésité, les diètes riches en matières grasses, la testostérone, le jeûne, les stimulateurs du système β-adrénergique, l'insuline et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (308).

En conclusion, de nombreuses questions relatives à la résistine demeurent sans réponse et il est évident que des études supplémentaires sont requises afin de définir, avec précision, les fonctions biologiques de la résistine et son rôle dans les pathologies associées à la résistance à l'insuline.

L'adiponectine, également nommée apMI, Acrp30, gelatin-binding protein 28 ou apidoQ est une autre protéine issue du tissu adipeux blanc et en mesure de contrôler la sensibilité à l'insuline (308, 309). Chez l'humain, l'adiponectine est abondante et représente près de 0.01% des protéines totales plasmatiques (310), même si son expression est exclusive au tissu adipeux dans des conditions normales (311). Elle appartient à une superfamille de collagènes et présente une homologie importante avec le collagène X, VIII, le facteur complément C1q et le TNF-α (312). Plusieurs facteurs, mécanismes ou conditions contrôlent la synthèse et la sécrétion de l'adiponectine, tels que l'insuline (313), l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (314), le TNF-α (315), les PPAR (316) et la différentiation des préadipocytes en adipocytes matures (317). Finalement, contrairement aux autres adipocytokines, on note une diminution de l'expression et des niveaux plasmatiques d'adiponectine en présence d'obésité (autant chez les adultes

(310) que chez les enfants (318)), de résistance à l'insuline (319) ou du diabète de type 2 (320). Dans ces conditions, les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont davantage associées à la résistance à l'insuline et aux marqueurs lipidiques du syndrome de résistance à l'insuline qu'à la masse adipeuse, ce qui suggère fortement un rôle de l'adiponectine dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Chez l'animal, l'administration d'adiponectine améliore la sensibilité à l'insuline, réduit la gluconéogenèse hépatique et augmente la tolérence au glucose (596).

L'impact positif de l'adiponectine sur la sensibilité à l'insuline est exercé de diverses manières. Cependant, les données expérimentales disponibles jusqu'à ce jour obtenues majoritairement chez la souris montrent que l'effet principal de cette adipokine se répercute principalement sur le foie, mais également sur le muscle. Premièrement, elle augmente l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras et accélère ainsi leur oxydation au niveau du muscle. Conséquemment, le contenu intramusculaire de triglycerides ainsi que les niveaux plasmatiques d'acides gras libres diminuent, ce qui améliore la sensibilité à l'insuline. De plus, le domaine C-terminal de l'adiponectine intensifie remarquablement la phosphorylation tyrosine de l'IRS-1 et de la protéine kinase B induite par l'insuline, et ce, dans le muscle squelettique (321). Finalement, l'adiponectine contribue à l'induction de la sensibilité à l'insuline en réduisant la gluconéogenèse hépatique (322) et en inhibant la sécrétion ainsi que la signalisation du TNF-α (323). De toutes récentes études humaines confirment

l'impact de l'adiponectine sur phosphorylation tyrosine au niveau du récepteur à l'insuline (596).

Mis à part les effets reliés à la sensibilité à l'insuline, l'adiponectine est impliquée dans le contrôle de l'équilibre énergétique et du poids corporel (321), ainsi que dans la diminution des processus inflammatoires et au niveau de l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (324). En outre, l'adiponectine peut supprimer l'athérogenèse en réduisant l'accumulation de particules LDL oxydées dans la paroi vasculaire (325). L'ensemble de ces observations suggèrent donc qu'une déficience en adiponectine, telle que notée dans les états d'obésité ou de diabète, peut contribuer à l'accélération du processus athérosclérotique. Il s'agit donc d'une nouvelle cible prometteuse en ce qui a trait au traitement de l'obésité et des pathologies associées.

Cette dernière section décrira le rôle de l'IL-6 (326), une autre cytokine proinflammatoire associée à la résistance à l'insuline. Il s'agit d'une cytokine multifonctionnelle produite par un large éventail de types cellulaires dont les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes. Elle est impliquée dans la réponse inflammatoire et induite par le stress (327). L'IL-6 est également sécrétée par le tissu adipeux dans des conditions non-inflammatoires, soit au cours de la période post-prandiale (328). En réalité, près du tiers de la quantité totale circulante d'IL-6 provient du tissu adipeux, surtout de la région omentale (329). Conséquemment, l'obésité est associée à une forte sécrétion d'IL-6, entraînant divers effets métaboliques indésirables. En tant que conditions pathologiques associées à

l'augmentation des niveaux d'IL-6, on peut citer l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline. Dans le cas de l'hypertension, l'IL-6 contribue à la stimulation des systèmes nerveux central et sympathique (330), à l'induction du fibrinogène, augmentant la viscosité sanguine (331) et à l'augmentation de l'expression de l'angiotensinogène suivie par une hausse de la concentration d'angiotensine II (332). L'IL-6 intervient sur plusieurs circuits métaboliques provoquant la dyslipidémie: une hypersécrétion de TG par le foie (333), une forte concentration plasmatique de TG à jeun, une proportion élevée des TG contenus dans les particules VLDL, et des taux élevés d'acides gras libres suite à une charge glucidique (326). Finalement, les niveaux d'IL-6 sont corrélés avec des paramètres de la sensibilité à l'insuline reflétant une résistance à l'insuline (334, 335). De fortes concentrations d'IL-6 sont d'ailleurs en mesure de prédire le développement du diabète de type 2 (336). Cette association n'est pas étonnante étant donné les nombreuses données en faveur du concept percevant la résistance à l'insuline comme une pathologie chronique ayant une composante inflammatoire. *In vitro*, l'IL-6 induit une inhibition dose-dépendante de la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques, stimulée par le glucose (337, 338). Par ailleurs, la résistance à l'insuline induite par l'IL-6 peut également se manifester au niveau hépatique sous la forme d'une sécrétion élevée de glucose, une inhibition de la glycogène synthase, une activation de la glycogène phosphorylase et une production accrue de TG (339). Le mécanisme sous-jacent consisterait en une inhibition de la signalisation précoce au niveau du récepteur à l'insuline suite à une diminution de la

phosphorylation tyrosine du IRS-1 ainsi que de l'action de l'insuline à des étapes ultérieures (340).

6) Fatty Acid Binding Protein (FABP)

Les FABP ou Protéines transporteuses d'acides gras représentent un groupe de protéines de poids moléculaire variant entre 12 et 15 kDa qui possèdent une similitude de séquence de 20 à 70%. De plus, les neuf membres de cette famille démontrent une expression spécifique à chaque tissu, ce qui suggère la possibilité d'une spécialisation fonctionnelle (341).

Globalement, la fonction principale de ces protéines est le transport intracellulaire des acides gras libres (341, 342), mais d'autres rôles leur ont été également conférés: la régulation du métabolisme des acides gras, la signalisation intracellulaire, la différenciation adipocytaire, la détermination des compartiments en prévision d'un dépôt d'acides gras, la modulation de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras ou la protection cellulaire vis-à-vis de la toxicité des acides gras hydrophobes ou d'autres substances nocives (341,343, 344). Ces protéines ont une affinité préférentielle pour les acides gras à chaîne longue (C_{16}-C_{20}), mais aussi pour d'autres ligands hydrophobes, comme les PL et le cholestérol (343).

Dans l'entérocyte, deux FAPB assurent le transport des acides gras: la Liver-FABP (L-FABP ou FABP-1) et la Intestinal-FABP (I-FABP ou FABP-2) (344). Cette dernière a été étudiée en profondeur depuis la mise en évidence

du fait que le polymorphisme Ala54Thr dans le gène codant pour la I-FABP est associé à une prédisposition au diabète de type 2 chez les Indiens Pima. Pour cette même raison, notre projet vise exclusivement cette forme de FABP.

La I-FABP, le produit du gène FABP2 est une protéine de 15 kDa exprimée exclusivement dans les enterocytes du petit intestin. Elle contient un site de liaison unique qui affiche une forte affinité pour les acides gras à longue chaîne, autant saturés qu'insaturés. Un polymorphisme a été identifié au niveau de l'exon 2 du codon 54 du gène FABP2. Il résulte en un remplacement d'une guanine par une adénine se traduisant, à l'échelle protéique, par la substitution d'une alanine (Ala) par une thréonine (Thr). Cette modification altère non seulement les propriétés structurales de la protéine, mais aussi sa stabilité ou son affinité pour les ligands correspondants. Dans ce sens, il a été démontré que la version contenant la thréonine (I-FABP-Thr) avait une affinité pour les acides gras deux fois plus élevée que son homologue contenant l'alanine (I-FABP-Ala), ce qui suggère que l'allèle T pourrait être responsable d'une augmentation de l'absorption intestinale d'acides gras, d'une hausse des niveaux plasmatiques de lipides et possiblement d'un taux d'oxydation de lipides plus élevé. Selon le principe de Randle, ce mécanisme, en favorisant les acides gras en tant que substrat oxydatif causerait une épargne du glucose, ce qui augmenterait la sécrétion d'insuline et résulterait en une résistance à l'insuline (345). Des données obtenues *in vitro* révèlent une sécrétion de TG de 2 à 3 fois plus élevée lors d'une transfection des cellules Caco-2 par l'allèle T54 (346). Sur la base de

cette observation, il serait donc logique de penser que ce polymorphisme conférerait une susceptibilité à la résistance à l'insuline ou au diabète de type 2 chez les individus porteurs de l'allèle muté.

De nombreuses études ont tenté d'établir une association entre la présence de I-FABP-Thr et ces états pathologiques, mais une controverse persiste à ce niveau. La prévalence de ce polymorphisme est similaire chez les sujets normaux, diabétiques ou obèses. Par contre, elle varie selon les groupes ethniques: 22% chez les Africains-Americains, 36-41% chez les Japonais, approximativement 30% chez les Caucasiens (347) et 29% chez les Indiens Pima (345). Chez les Indiens Pima (348), reconnus pour leur plus forte prévalence de diabète de type 2, l'allèle T54 a été relié à des manifestations propres à la résistance à l'insuline, telles qu'une hausse de l'insulinémie à jeun, de la réponse insulinique, de l'oxydation des lipides et une diminution de la captation du glucose déclenchée par l'insuline. De plus, au sein de la même population, les acides gras libres plasmatiques et la réponse insulinique à un repas riche en lipides sont plus élevés en présence de l'allèle T (349). Par contre, aucune association n'a été trouvée avec le diabète de type 2 (345). Récemment, une corrélation de ce genre a été notée au sein d'un groupe d'Indiens de la Guadeloupe (350). Chez les aborigènes Canadiens, Hegele et coll. n'ont pas été en mesure d'établir de lien entre ce polymorphisme et les lipides plasmatiques dans une population adulte (351), et ce, contrairement aux données recueillies au sein d'un groupe de jeunes adolescents, où un taux élevé de TG plasmatiques était relié à l'allèle T54 (352). Fait surprenant, l'allèle FABP2 T54 est plus fréquent chez les Inuits

habitant les Territoires du Nord-Ouest Canadien, une population réputée pour leur faible prévalence de maladies coronariennes, que chez les Indiens Pima et les blancs Nord-Américains (353).

Chez les Japonais, le polymorphisme du FABP n'est pas relié au diabète de type 2, à la sensibilité à l'insuline, à l'hyperinsulinémie, à l'obésité ou à la dyslipidémie (354-357). Toutefois, au sein de cette même population, des mesures à l'ultrason ont montré une plus grande accumulation de tissu adipeux intra-abdominal souvent accompagnée d'une résistance à l'insuline, en présence de l'allèle T(358).

Dans la population finlandaise, la controverse y est aussi présente. En effet, on a confirmé le manque d'association entre l'allèle T54 et des paramètres militant en faveur d'un syndrome d'insulino-résistance ou d'un diabète de type 2, et ce, autant chez les sujets normaux, diabétiques (359, 360), obèses (361, 362) ou atteints d'hyperlipidémie familiale (363). Par contre, l'allèle T semble corrélé à une lipémie postprandiale élevée associée à une réponse insulinique proportionnelle (364).

En ce qui concerne les autres types de Caucasiens, on rapporte des taux plus élevés d'insuline à jeun concomitante avec une sensibilité à l'insuline réduite (365, 366), une hypertriglycéridémie à jeun ou post-prandiale (347) et une plus grande susceptibilité vis-à-vis des accidents cérébro-vasculaires (367) en présence du variant Thr. Par contre, une absence d'association entre ces paramètres et le génotype du I-FABP a été également remarquée (368-371). De plus, le variant T54 est relié à une plus grande diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol total, de LDL-C et d'apo

B, suite à une diète riche en fibres solubles (372, 373). Finalement, le diabète de type 1 n'affiche pas d'interaction avec le variant Thr (374).

En résumé, il est évident que ces études divergent autant dans la conception du protocole que dans les résultats obtenus, ce qui rend toute comparaison et toute extrapolation difficiles à accomplir. Toutefois, il est très possible que ce génotype contribue à un terrain de susceptibilité vis-à-vis de certaines pathologies, telles que la résistance à l'insuline ou le diabète de type 2, mais il requiert, pour son expression, d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux qui pourraient varier d'une population à une autre.

7) Microsomal triglyceride transfer protein (MTP)

Le MTP est un hétérodimère soluble composé d'une sous-unité de 97 kDa qui confère à la protéine sa capacité de transfert de lipides lorsque son co-facteur, le Protein disulfide isomerase (PDI), une sous-unité de 55 kDa, est présent. Le rôle du MTP est essentiel à l'assemblage des lipoprotéines contenant l'apo B, et ce, autant au niveau intestinal qu'hépatique. Cette protéine catalyse le transport des TG, du cholestérol ester et des PL entre les membranes du RE, quoiqu'elle affiche une préférence pour les deux premiers (375). En outre, un défaut génétique résultant de mutations dans le gène codant pour le MTP est responsable de l'abêtalipoprotéinémie, une pathologie rare autosomique récessive caractérisée par l'incapacité de synthétiser des chylomicrons ou des VLDL (376-378). Les manifestations

cliniques comportent la malabsorption des lipides et des vitamines liposolubles, l'hypocholestérolémie, la dégénération pigmentaire de la rétine et l'ataxie (377, 379).

De nombreuses études ont tenté de définir le rôle exact du MTP dans la production des lipoprotéines. Même si une controverse persiste en ce qui a trait aux détails de ce processus, un consensus général a été établi. Ainsi, durant sa synthèse, l'apo B subit une translocation à travers la membrane du RE et une addition de lipides débute autour de cette apolipoprotéine. Ce transfert de lipides vers l'apo B est un processus accompli par le MTP. Lors de cette première étape, on assiste à la formation d'une petite particule lipoprotéinique, à laquelle s'ajouteront des TG, et ce, soit par l'entremise de la fusion d'une gouttelette lipidique à la particule préformée ou par l'addition de molécules lipidiques individuelles, également sous l'action du MTP. Sans cette lipidation, l'apo B naissante serait dégradée, en empruntant la voie ubiquitine-protéasome et compromettrait ainsi la synthèse des lipoprotéines (377, 379-381).

Il est évident que toute modification dans l'expression de cette protéine, telle que la variabilité génétique pourrait influencer la production des lipoprotéines. Trois polymorphismes situés en amont du site de transcription du gène du MTP ont été identifiés jusqu'à ce jour : -400 (MTP-400 (A-T)), -164 (MTP-164 (T-C)) et -493 (MTP-493 (G-T)). Le polymorphisme situé à –493 est l'unique polymorphisme du gène du MTP sur lequel des études *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées, puisque les deux premiers ne sont pas fonctionnels ou n'ont pas montré d'association avec le profil lipidique (382,

383). Il est à préciser que le nombre d'études *in vitro* et *in vivo* portant sur le polymorphisme -493 du MTP est assez restreint, ce qui souligne la nécessité d'intensifier les recherches dans ce domaine.

Malgré ceci, des études *in vitro*, plus précisément dans les cellules HepG2 ont permis d'attribuer à l'allèle T, une augmentation de l'expression du gène du MTP, suite à l'absence de fixation de protéines nucléaires pouvant agir en tant que répresseurs (384). Chez la souris, une surexpression du MTP hépatique produit une augmentation de la sécrétion des TG et de l'apo B associés aux particules VLDL (385). Ce gène pourrait donc avoir une contribution non-négligeable dans le développement des maladies cardiovasculaires en raison de son impact sur le profil lipidique.

À l'échelle populationnellle, l'allèle T a une fréquence variant entre 0,24 et 0,27 (382, 384, 386, 384). Et tout comme pour le polymorphisme Ala54Thr du I-FABP, une controverse entoure la relation entre le génotype du MTP et le profil lipidique ou les éléments associés au syndrome de résistance à l'insuline. En effet, chez des hommes sains, d'origine suédoise, les taux plasmatiques de cholestérol total, de LDL cholestérol et d'apo B se sont avérés plus réduits chez les homozygotes pour l'allèle –493 T en comparaison avec les sujets porteurs d'au moins un allèle G, et ce, malgré un risque plus elevé de maladies cardiovasculaires (388). En ce qui a trait aux variables anthropométriques et aux valeurs d'insuline, ce même groupe d'homozygotes a montré des valeurs plus élevés pour l'IMC, le tour de taille et l'insulinémie (382). Ces données sont renforcées par des résultats obtenus dans une population d'hommes d'origine canadienne française montrant une

association entre le polymorphisme –493 G/T et d'une part, une diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol total et apolipoprotéine B reliée aux particules LDL chez les sujets ayant une adiposité viscérale réduite et d'autre part, une détérioration des profils lipidique et lipoprotéinique chez les sujets présentant une hyperinsulinémie (389). Cependant, ces résultats sont opposés aux données obtenues dans une cohorte de jeunes hommes de race noire, examinée pendant 10 ans, où on a pu constater une augmentation des taux plasmatiques de TG, de cholestérol total, d'apo B et de LDL-c associée à la présence du génotype T/T (386). Dans le même sens, chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, ce polymorphisme serait responsable uniquement d'une diminution des niveaux sériques de TG et du maintien des taux de cholestérol total et LDL constants (390). Finalement, aucune association n'a été établie entre le génotype du polymorphisme –493 du gène du MTP et les niveaux plasmatiques de lipides, de lipoprotéines, la composition et la taille des particules lipoprotéiniques ou les variables anthropométriques, et ce, chez les sujets participant aux études Framingham Offspring (387) et Family Based Association, en Micronésie (391), ainsi que chez des sujets présentant une obésité abdominale (392).

Chez des sujets diabétiques, on rapporte que l'allèle T est associé à une hypertriglycéridémie (393), à une diminution des niveaux plasmatiques de LDL-C, ainsi qu'à une augmentation des particules VLDL contenant l'apo B-48 dans la période post-prandiale (394) et des particules de LDL petites et denses (393, 395). De plus, dans cette population, l'allèle T est relié à des niveaux plus élevés d'enzymes hépatiques indiquant la présence d'une

stéatohépatite non due à l'alcool, fréquente chez les diabétiques, ce qui indique que le gène du MTP est un candidat à considérer dans la modulation génétique de la susceptibilité à la stéatose hépatique. Cette hypothèse acquiert de la validité si on prend en considération le fait que l'absence d'une protéine fonctionnelle, telle que dans l'abêtalipoprotéinémie est associée à la stéatose hépatique (396). Finalement, l'influence directe du génotype du MTP sur la taille des particules LDL reste encore sujet à controverse, puisqu'on a révélé d'une part, une absence d'impact génotypique et d'autre part, une plus forte concentration de particules de LDL petites et denses chez des sujets diabétiques ou présentant une hyperinsulinémie (389, 393, 395), et ce, en présence de l'allèle T. Dans la grande majorité des études ci-haut mentionnées, l'effet de l'allèle T semble être récessif lorsqu'il s'agit du contrôle des niveaux lipidiques.

L'explication pouvant accompagner la réduction des taux de LDL chez les sujets homozygotes pour l'allèle T réside dans la synthèse et la sécrétion d'un nombre plus réduit de particules VLDL enrichies en lipides. En effet, une lipidation plus efficace des particules de VLDL naissantes serait causée par une surexpression du MTP et comme ce type de lipoprotéines ne constitue pas un précurseur direct des LDL, ces dernières afficheraient un taux réduit (382). Toutefois, la discordance entre les données obtenues au sein des différentes populations ne peut être négligée et peut être attribuée à la spécificité génétique des populations étudiées, à la taille des échantillons étudies, à l'inclusion de certaines co-variables lors de l'analyse statistique,

ainsi qu'à un effet modeste, masqué ou inexistant de ce polymorphisme sur les différentes variables analysées.

8) Taille des particules LDL

La contribution du cholestérol dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires a été clairement établie dans le cadre de plusieurs études cliniques ou d'observations épidémiologiques (397). Cependant, l'analyse du risque cardiovasculaire s'est traditionnellement concentrée sur la notion de cholestérol et non de lipoprotéine. On fait référence au bon et au mauvais cholestérol, sans prendre en considération qu'il s'agit en réalité des particules HDL et LDL qui sont fonctionnellement favorables ou défavorables. Tel qu'il sera montré au cours de cette section, la taille des particules LDL représente une source d'information tout aussi sinon plus déterminante que la simple mesure du cholestérol total ou du LDL-C pour évaluer avec précision le risque athérosclérotique. En fait, un grand nombre de personnes souffrant de maladies cardiovasculaires ont des valeurs de cholestérol total à l'intérieur des limites acceptables (398). De même, un nombre élevé de particules de LDL petites et denses est davantage présent chez les sujets atteints de maladies cardiovasculaires que des valeurs de LDL-C anormalement élevées (399).

Du point de vue clinique, la majorité des laboratoires emploie une combinaison de mesures chimiques pour dépister les anomalies lipidiques.

Les pratiques ont toutefois peu évolué, malgré une meilleure compréhension du rôle des particules lipoprotéiniques dans le développement de l'athérosclérose. Cette attitude conservatrice découle probablement des difficultés de nature technique reliées à la mesure du nombre et de la taille des particules LDL.

Tel que mentionné, les particules LDL représentent le transporteur principal de cholestérol dans la circulation sanguine. En moyenne, elles ont un diamètre de 22nm et sont composées de 20% protéines, 20% PL, 40% cholestérol ester, 10% cholestérol libre et 5% TG (400). Cependant, ces lipoprotéines de basse densité constituent un spectre hétérogène de particules qui diffèrent selon la taille, la densité, la composition lipidique (401-403), la mobilité électrophorétique (404), le contenu en antioxydants (405) ou l'affinité pour le récepteur LDL (406). Globalement, la densité varie entre 1.019 et 1.063 g/ml et les diamètres des particules, entre 22 et 30 nm (407-409). L'électrophorèse sur gel gradient et l'ultracentrifugation analytique ont permis d'identifier sept populations différentes de particules LDL: LDL-1 (d=1.019-1.033g/ml), LDL-2 et LDL-3 (d=1.033-1.038 g/ml), LDL-4 et LDL-5 (d=1.038-1.050 g/ml), ainsi que LDL-6 et LDL-7 (d=1.050-1.063 g/ml) (408-410). Chez les sujets normaux, on retrouve habituellement un seul pic prépondérant, mais dans les cas d'hyperprébêtalipoprotéinémie et d'hypertriglycéridémie, la dispersion des types de particules est plus évidente (408, 411, 412). Sur la base de cette hétérogénéité, une classification illustrant le risque athérosclérotique a été établie. Ainsi, on attribue le profil A aux personnes ayant une quantité prédominante de LDL plus volumineuses

(> 255 Argstrom (Å)) et B à celles dont les particules sont majoritairement petites et denses (< 255 Å) (413). Le profil B caractérise près de 30-35% des hommes adultes et est moins fréquent chez les hommes âgés de 20 ans et moins, ainsi que chez les femmes pré-ménopausées (411).

Il est bien établi que les particules de LDL petites et denses font partie de la dyslipidémie caractérisant certaines maladies cardiovasculaires et la résistance à l'insuline, nommée phenotype lipoprotéinique athérogénique. Ces LDL sont souvent associées à une hypertriglycéridémie et à des taux abaissés de cholestérol HDL (414). L'association entre les particules de LDL petites et denses (taille inférieure à 25,5 nm et densité supérieure à 1,04 g/ml) et un risque élevé de maladies coronariennes ou de maladies cardiaques ischémiques a été confirmée par de nombreuses études (414-424). En réalité, le profil des lipoprotéines accompagnant la prédominance des LDL petites et denses triple la susceptibilité de développer des maladies cardiovasculaires (411). Parmi les études épidémiologiques les plus importantes établissant ce lien, on peut citer la Physicians' Health Study (425), la Stanford Five-City Project (426), la Quebec Cardiovascular Study (419), la Women's Health Study (427), la Strong Heart Study (428) et la Honolulu Heart Program (423). La conclusion de l'ensemble de ces études concernant l'étroite association entre la taille des particules LDL et les maladies cardiovasculaires est unanime. Il reste néanmoins à déterminer s'il s'agit d'un facteur de risque indépendant, en vue de la présence simultanée d'autres facteurs de risque tels que des taux réduits de HDL-C et l'hypertriglycéridémie.

Mis à part l'association à d'autres anomalies métaboliques, le potentiel athérogène des particules petites et denses provient de plusieurs caractéristiques qui leurs sont propres. Tout d'abord, on note une plus grande susceptibilité à l'oxydation (429, 430), très probablement due à l'insaturation des acides gras présents dans la couche phospholipidique de surface ou à une interaction entre ces PL et l'apo B (431, 432). Par ailleurs, on retrouve une affinité plus réduite pour le récepteur LDL mais plus élevée pour le récepteur scavenger (433) et une forte interaction avec les protéoglycans de la paroi artérielle (434). Tous ces mécanismes résultent en une augmentation du temps de résidence des LDL dans la circulation et favorisent l'interaction et l'infiltration de ces particules au niveau de la paroi endothéliale. Clairement, on remarque que l'influx des particules LDL à travers l'endothélium et dans l'espace subendothelial est effectué en fonction de leur taille (435). En ce qui a trait à la dysfonction endothéliale qui représente une des étapes précoces du processus athérosclérotique, la taille des particules LDL est directement associée à la vasodilatation induite par le flux sanguin et aux molécules d'adhésion cellulaires, telles que la Vascular-cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), l'Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) et la E-selectine (436).

D'autre part, le phénotype caractérisé par les particules de LDL petites et denses est une composante essentielle du syndrome de résistance à l'insuline ou du diabète de type 2 (437-439). Plusieurs études ont effectivement rapporté que la taille des particules LDL se présente en relation inverse avec plusieurs caractéristiques du syndrome de résistance à

l'insuline, notamment l'insulinémie à jeun et la résistance à l'insuline, la triglycéridémie (440), l'obésité abdominale (441), l'hyperlipidémie post-prandiale (442) ou avec le regroupement des facteurs correspondant à ce syndrome (443, 444). Cette étroite association suggère que la taille des particules LDL représente une partie intégrante du syndrome de résistance à l'insuline, ce qui laisse présager que la définition de ce syndrome pourrait être reconsidérée, dans le but d'y inclure la taille des particules LDL (445).

L'héritabilité du phénotype correspondant à la taille des LDL, telle que déterminée par une analyse chez des jumeaux mono- et dizygotes, a été estimée à environ 30-50%, ce qui démontre l'importance de l'influence complémentaire des facteurs environnementaux (446). Toutefois, des analyses de ségrégation complexe ont indiqué que le phénotype B est sous l'influence de gènes majeurs et de transmission autosomique dominante, ainsi que d'éléments polygéniques additionnels. Ceci pourrait expliquer une partie de l'agrégation familiale des niveaux de lipides et de lipoprotéines ou du risque cardiovasculaire (447, 448). Une liaison significative a été trouvée avec les marqueurs du chromosome 19p13.3, plus précisément au niveau du locus correspondant au récepteur LDL (420). Il est toutefois à préciser qu'il est improbable qu'une mutation au niveau de ce récepteur soit responsable des effets observés sur la taille des particules LDL (449). Par ailleurs, la taille des particules LDL a été associée à d'autres locus, certains étant connus pour leur implication dans le métabolisme lipidique: le regroupement des gènes apo A-I/CIII/A-IV et les gènes de la manganèse superoxide dismutase, la CETP (450, 451), l'apo B (452), la LH (453), la LPL (454), la FATP-1 (plus

précisément le polymorphisme G/A dans l'intron 8) (455), l'apo E (seule ou en interaction avec la LH) et le récepteur β3-adrénergique (plus précisément le polymorphisme Trp64Arg) (456). Une analyse récente effectuée dans le cadre de l'Étude des Familles de Québec a révélé la présence d'un locus majeur situé sur le chromosome 17q (17q21.33), ainsi que de plusieurs autres locus susceptibles d'influencer la taille des particules LDL. Ces derniers correspondent à un large éventail de gènes candidats : l'apolipoproteine H, le récepteur (2) de l'apo E, les membres de la famille de la phospholipase A2, ainsi que la HMG-CoA réductase (457). Il semble de plus en plus clair que les différences, autant dans la caractérisation phénotypique que dans les effets des contextes génétique et environnemental sont en mesure de contribuer à la diversité des particules LDL.

Mis à part la prédisposition génétique, la taille des particules peut être également influencée par des facteurs tels que l'âge et le sexe (409), la thérapie par des oestrogènes (458) ou certaines composantes nutritionnelles Dans ce cas, cette relation est réciproque puisque le phénotype LDL peut également influencer la réponse métabolique à une diète donnée. Par exemple, l'analyse de la réponse lipidique à une diète réduite en matières grasses, révèle une réduction des taux de LDL-C deux fois supérieure chez les sujets présentant un phénotype B, ainsi qu'une baisse des niveaux d'apo B, ce qui suggère un plus petit nombre de particules LDL. Par contre, on assiste à un passage du phénotype A vers un phénotype B lors de l'administration d'une diète similaire à des sujets en santé (459).

Probablement, les individus à risque, soit avec des taux élevés de LDL-C ou de particules petites et denses sont de meilleurs candidats pour des diètes réduites en matières grasses et on recommande une précaution particulière lors de l'administration de telles diètes chez les sujets à faible risque cardiovasculaire. Les changements dans la composition en acides gras des diètes peuvent également influencer la structure des particules LDL. Les apports élevés en AGS, notamment en acides myristique et palmitique, sont associés à une augmentation de la concentration de particules de LDL larges et enrichies en cholestérol, et à une baisse compensatoire en particules petites et denses. Si les AGPI, AGMI (460) ou les huiles de poissons (461) n'ont affiché aucune influence sur la taille des particules des sujets normaux, cette dernière catégorie occasionne l'augmentation de la taille des LDL chez les sujets hyperlipidémiques (462) et chez des sujets présentant un diabète de type 2 (463).

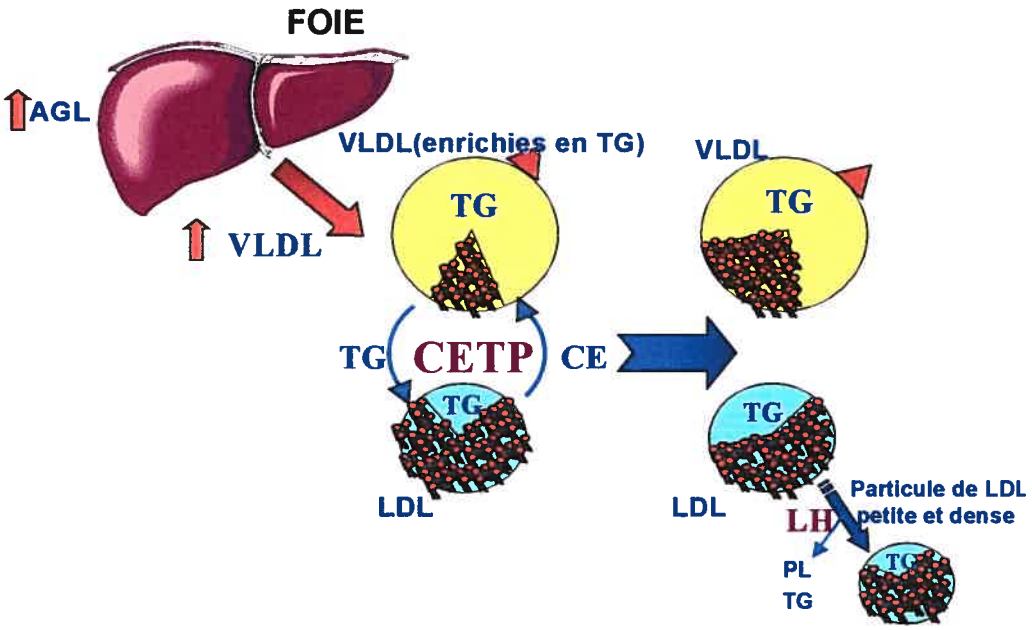
Le mécanisme de formation des particules de LDL petites et denses, tel que présenté dans la figure 4 trouve ses racines dans un enrichissement en TG des particules VLDL sécrétées par le foie. L'intensité de la synthèse et de la sécrétion des VLDL est déterminée par la disponibilité des substrats lipidiques comme les acides gras libres ou les lipoprotéines provenant de la périphérie. Dans ce contexte, le foie est en mesure de sécréter un large spectre de particules VLDL variant autant dans la densité que dans la taille, et ce, dépendamment du contenu en TG. Ainsi, chez les individus normaux, ayant des taux de TG en dessous de 1,5-1,6 mmol/L, le foie produit de petites VLDL. Cependant, en présence d'une hypertriglycéridémie, les particules

VLDL sécrétées sont enrichies en TG, devenant ainsi moins denses et plus larges. Dans le plasma, les TG contenus dans la particule de VLDL sont dégradés sous l'action de la LPL. Toutefois, à cette étape, on retrouve une compétition pour l'action de cette enzyme entre les VLDL d'une part et les chylomicrons ou les R-CM d'autre part. Ceci résulte en une prolongation du temps de résidence en circulation des particules VLDL, favorisant ainsi des échanges de substrats lipidiques entre les différentes classes de lipoprotéines dans la cascade VLDL-IDL-LDL (464, 465).

Dans le cadre de ces échanges, deux enzymes-clé interviennent activement : la CETP et la LH. La CETP est responsable d'un échange de lipides neutres entre les lipoprotéines, se manifestant comme un transfert de cholestérol ester des HDL ou les LDL vers les VLDL, et ce, en échange de TG, causant ainsi un remodelage des lipoprotéines. Lorsque les taux de lipoprotéines riches en TG augmente, tels que les VLDL et les chylomicrons, cette action se traduit par un transfert accéléré de leur contenu en TG vers les LDL ou les HDL. Puisque le plasma ne contient pas une activité cholesteryl transferase suffisante, le catabolisme lipolytique des particules lipoprotéiniques contenant l'apo B dépend étroitement de l'hydrolyse des TG. Ainsi, les LDL enrichis en TG deviennent un substrat pour les lipases endothéliales et la LH, et la dégradation de leur contenu lipidique conduit à la formation de particules petites et denses (415, 464). Cette lipase est synthétisée surtout par les hépatocytes et est localisée à la surface des capillaires des sinusoïdes hépatiques. Par ailleurs, cette lipase est beaucoup plus efficace en ce qui concerne l'hydrolyse des lipides contenus dans les

particules LDL que dans les VLDL (466, 467). Ce mécanisme met donc en évidence le rôle essentiel des TG circulants dans la formation de particules de LDL petites et denses (445). Une fois formées, les LDL petites et denses résident plus longtemps en circulation que les LDL de taille normale, ce qui est dû à une faible reconnaissance des petites particules par le récepteur LDL. Par contre, ces particules interagissent davantage avec les récepteurs scavengers, résultant en la formation de cellules spumeuses, connues pour leur implication dans l'athérogenèse (468).

Figure 4 : Mécanisme de formation des particules de LDL petites et denses



Légende :

En présence d'un flux accru d'acides gras vers le foie, les particules VLDL sécrétées sont enrichies en TG. La prolongation du temps de résidence en circulation de ces dernières favorise les échanges de substrats lipidiques avec les particules LDL. Sous l'action de la CETP, on assiste à un transfert de cholestérol ester) des LDL vers les VLDL, et ce, en échange de TG. Ainsi, les LDL enrichis en TG deviennent un substrat pour la LH, et la dégradatioran de leur contenu lipidique conduit à la formation de particules petites et denses. Abréviations : AGL : acides gras libres; CE : cholestérol ester; CETP : cholesterol ester transfer protein; LDL : low density lipoprotein; LH : lipase hépatique; PL : phospholipides; TG : triglycérides; VLDL : very low density lipoprotein.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la mesure directe de la taille des particules LDL. Ainsi, on peut citer l'ultracentrifugation visant la séparation des particules LDL selon un gradient de densité (469), la

microscopie cryo-électronique (470), la chromatographie d'exclusion selon la taille qui est une technique impliquant la séparation par colonne accompagnée par une visualisation des particules LDL à l'UV (280mn) (471), le système Quantimetrix Lipoprint LDL basé sur une électrophorèse dans un tube de polyacrylamide (3%) de haute résolution et suivie par une analyse densitométrique (472) et la dispersion de lumière qui fait appel à la vitesse de diffusion des particules de LDL dans un milieu donné en fonction du diamètre de la particule (473). En outre, on peut mentionner la résonance magnétique nucléaire (NMR), une méthode spectroscopique de plus en plus utilisée et basée sur les signaux caractéristiques véhiculés par les sous-classes de lipoprotéines. Ainsi, chaque signal est constitué de l'agrégation des groupements methyl-terminaux provenant des lipides contenus dans la particule qui sont grandement affectés par le diamètre de cette dernière. Pour ces raisons, le signal methyl de résonance nucléaire magnétique émis par les particules représente une mesure directe de la concentration de la sous-classe de LDL en question (474). Il s'agit d'une méthode plus efficace que l'électrophorèse sur gel ou l'ultracentrifugation, puisqu'elle ne fait pas appel à un fractionnement physique des lipoprotéines. Toutefois, la plus répandue demeure l'électrophorèse sur gel gradient. Cette procédure est basée sur la migration différenciée des particules LDL en fonction de leur taille respective lors du passage de l'échantillon de plasma à travers une matrice de concentrations croissantes de polyacrylamide (2-16%). L'évaluation des dimensions des diamètres est faite en fonction de la distance de migration par rapport au point initial du gel. Par contre, les diamètres des pores du gel

diminuent de manière non-linéaire, ce qui peut causer une distorsion dans la distribution des particules. Ainsi, pour remédier à ce problème, des standards de diamètres connus, ainsi que deux standards internes accompagnent systématiquement les échantillons lors de chaque expérience. Les premiers standards sont généralement constitués de trois ou quatre populations de particules LDL de différentes tailles, ainsi que de deux protéines globulaires: la ferritine et la thyroglobuline. Suite à la migration, on procède à une coloration au Bleu de Coomassie, destinée à révéler les protéines faisant partie de la lipoprotéine. Finalement, l'image est analysée grâce à un logiciel d'analyse d'image de haute précision et les diamètres des particules des échantillons sont déduits d'une courbe de calibration construite à partir des standards. La précision de l'analyse comprend plusieurs aspects, dont la qualité des échantillons qu'on y applique, la migration, la qualité de l'image et l'exactitude avec laquelle la lecture des gels est effectuée. Par conséquent, l'interprétation des données peut présenter certaines variations et le contrôle de la qualité des estimations d'avère essentielle (411, 419, 421).

Étant donné les limites de nature technique que les méthodes directes ci-haut mentionnées peuvent présenter et dans le but de trouver des marqueurs plus accessibles, plusieurs recherches ont tenté de déterminer la taille des particules LDL à partir de rapports qui comportent des données cliniques ou analytiques provenant d'un bilan lipidique classique. Dans ce sens, plusieurs solutions ont été suggérées, mais leur capacité à refléter la taille exacte des particules, vis à vis d'une méthode directe reste à éclaircir. Ainsi, la triglycéridémie s'est avérée un bon élément prédicteur indépendant,

autant chez les sujets normaux que diabétiques (414, 475, 476). La valeur des TG permettant de distinguer les deux phénotypes A et B se rapproche considérablement des valeurs ciblées par le NCEP ou par l'Association Américaine du Diabète. En fait, plusieurs auteurs ont remarqué un passage du phénotype A à B lorsque les TG franchissent le seuil de 1,1 à 1,5 mmol/L (95-130 mg/dl) (477). Couplée à la mesure du tour de taille, la triglycéridémie pourrait donc constituer un outil pratique pour l'identification des personnes présentant la triade métabolique, caractérisée par l'hyperinsulinémie, des valeurs élevées d'apo B et des particules de LDL petites et denses (478). Toutefois, une superposition a été identifiée dans les valeurs des TG entre les deux phénotypes, ce qui réduit la valeur prédictive de ce marqueur. D'autre part, malgré une association bien établie entre des valeurs réduites de HDL-C et une prépondérance de particules de LDL athérogènes, petites et denses, la relation entre les valeurs de HDL-C et la taille des particules LDL demeure faible (479-481). De manière surprenante, le rapport entre ces deux derniers paramètres, soient les TG et le HDL-C [TG/HDL, log (TG/HDL-C) ou HDL-C/TG] est en mesure de prédire l'un des deux phénotypes A et B (480), d'estimer la taille des particules LDL (482, 439) ou de prédire un risque cardiovasculaire (483).

Comme il n'y a qu'une molécule d'apo B dans une particule lipoprotéinique, le rapport apo B/LDL-C est présenté comme un meilleur indicateur athérosclérotique que les simples valeurs plasmatiques de LDL-C, puisqu'en déterminant les valeurs plasmatiques d'apo B, on tient compte du nombre de particules et de la quantité de cholestérol contenue dans la

particule de LDL, simultanément (415, 484-486). Tel que montré dans le cadre de l'Étude cardiovasculaire de Québec, l'apo B demeure un meilleur indicateur du risque des maladies artérielles coronariennes que les valeurs de LDL-C ou de cholestérol total (399). Cependant, la capacité d'un rapport incluant les valeurs d'apo B et LDL-C de prédire avec exactitude la taille des particules LDL demeure controversée. En effet, pour un groupe de sujets atteints du diabète de type II (475) et chez des sujets en santé (476), le rapport LDL-C/Apo B s'est avéré un outil efficace pour identifier les sujets présentant un phénotype B, caractérisé par une prédominance des particules LDL petites et denses. Par contre, les valeurs des tailles de particules LDL mesurées par électrophorèse sur gel gradient ont montré une très faible corrélation avec celles estimées à partir du rapport LDL-C/Apo B et ce, chez des sujets normaux ou hyperlipidémiques (487, 488). D'autres rapports, tels que CT/HDL-C (476) et apo B/HDL-C (480) ont été suggérés en tant qu'estimateurs de la taille des particules LDL, mais leur utilisation comme substitut d'une détermination directe est encore sous étude.

Malgré l'importance des sous-classes des particules LDL dans le processus athérosclérotique, très peu d'études ont examiné cet aspect chez les enfants ou adolescents. Dans le cadre de l'étude Bogalusa Heart Study (489) portant sur 918 jeunes âgés entre 10 et 17 ans, la distribution de la taille des particules LDL selon l'âge, le sexe, la race, les niveaux d'insuline et le poids relatif a été décrite. La taille des particules, déterminée par NMR varie entre 20.2 et 22.0 nm. Il est cependant à préciser que les valeurs relatives à la taille des particules LDL déterminées par cette technique

présentent d'importantes différences avec celles obtenues par électrophorèse sur gel gradient, ce qui rend la comparaison avec des données antérieures validées chez l'adulte quelque peu difficile. Toutefois, l'électrophorèse a permis d'estimer la prévalence du phénotype B (diamètre du pic majoritaire des LDL < 25,5 mn) chez les enfants, à 9.3%, et ce, au sein d'un groupe de 248 enfants japonais âgés entre 7 et 13 ans (490, 491). Cette étude a également facilité la caractérisation de la distribution et de la régulation des tailles des particules LDL chez des jeunes Japonais atteints de diabète de type 1 ou en santé (492-494). De plus, par cette même méthode, la prédominance des LDL petites et denses, estimée à 54% et 7.5% au sein d'un groupe d'adolescents obèses (495) et d'enfants âgés de 10 ans et moins (496), a été associée à plusieurs éléments du syndrome de résistance à l'insuline. D'autres études ponctuelles (497-501) se sont également intéressées à la taille des particules LDL chez les enfants et adolescents, cependant, aucune d'entre elles n'a permis de dresser un portrait global, ni étudié la relation entre la taille des particules LDL déterminée par une mesure directe et des valeurs estimées par des rapports obtenus à partir de paramètres lipidiques.

9) Rôle de la leptine dans le tractus gastro-intestinal

La leptine, le produit du gène ob est une protéine de 16 kDa principalement synthétisée dans le tissu adipeux dont la découverte, en 1994, a bouleversé la recherche dans le domaine de l'obésité. Elle est principalement synthétisée dans le tissu adipeux blanc, mais d'autres tissus sont également en mesure de la produire, en particulier le tissu adipeux brun, le placenta, les ovaires et le foie (291). Un an après sa découverte, son récepteur Ob-R a été cloné, et sa localisation dans de nombreux tissus suggère l'implication de la leptine dans une vaste gamme de fonctions physiologiques. Cette hormone a été longtemps considérée comme un signal destiné à informer le cerveau des réserves adipeuses par l'intermédiaire des récepteurs hypothalamiques visant à accomplir une fonction adipostatique . Ainsi, la leptine détient un rôle-clé dans la régulation du poids corporel en diminuant la prise alimentaire à travers de nombreux neurotransmetteurs hypothalamiques, en augmentant la dépense énergétique et en contrôlant la sécrétion de certaines hormones. La leptine agit via des récepteurs spécifiques dont au moins six isoformes ont été identifiées (OB-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Re), la forme active étant celle qui possède un long domaine intracellulaire, Ob-Rb (290). Ce dernier fait partie de la classe I des récepteurs reconnaissant les cytokines et son activation s'initie par le système Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription) (JAK-STAT), permettant la majorité des fonctions de cette hormone (502).

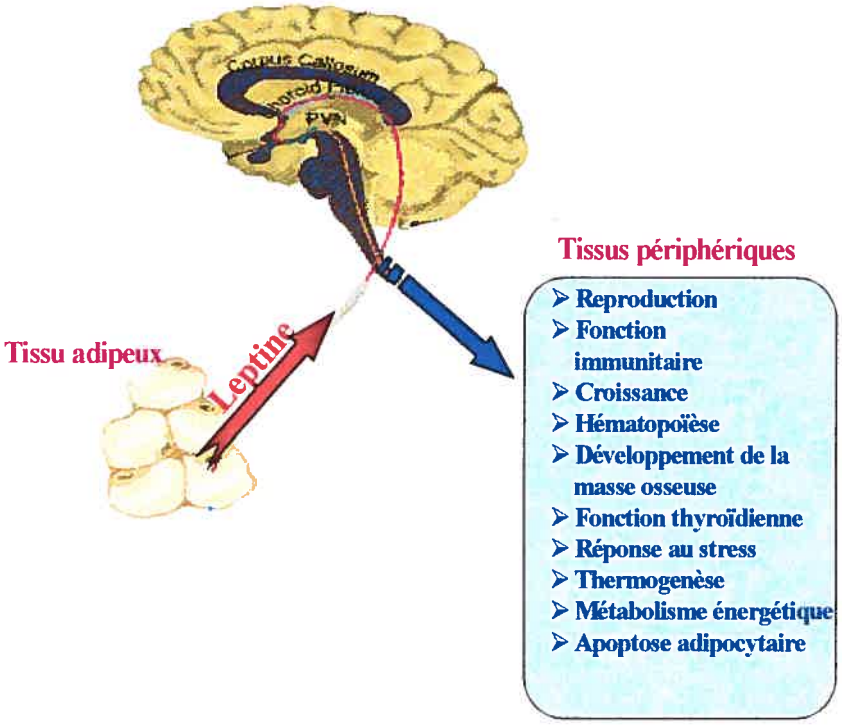
L'expression périphérique du récepteur fonctionnel de la leptine démontre clairement que les propriétés de la leptine dépassent celles d'un simple signal de satiété (503). Ainsi, même si les effets visant le contrôle du poids corporel sont médiés à travers l'action de la leptine dans l'hypothalamus, la présence du récepteur Ob-Rb a été localisée dans de nombreux autres tissus ou types cellulaires, dont le poumon, le rein, la rate, le cœur, le thymus, les macrophages, les lymphocytes T, les ovaires, le foie, le pancréas, l'estomac et l'intestin (290, 504-506). Ceci explique la vaste gamme de fonctions physiologiques influencées par cette hormone, énumérées dans la figure 5.

Ainsi, la leptine constitue un lien entre l'adiposité et les fonctions reproductrices (291, 507-509), fait partie intégrante de la réponse immunitaire, puisque ses niveaux s'élèvent lors d'infections et d'inflammations (288, 290, 504), agit en tant que facteur de croissance dans l'hématopoïèse (288) et l'angiogenèse (290), participe à la formation de la masse osseuse durant la croissance (288), tonifie le stimulus des hormones thyroïdiennes sur la production hypothalamique de la Thyrotropin releasing hormone (TRH) (288) et contrôle la réponse au stress en modulant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et l'activité du système nerveux central (289, 510).

En ce qui a trait à la contribution de la leptine dans la régulation du métabolisme, elle intervient dans le contrôle des événements métaboliques dans différents organes ou tissus en dirigeant le flux des nutriments vers une augmentation de la dépense énergétique (511). Elle est également en

mesure de promouvoir la lipolyse et l'apoptose dans le tissu adipeux et d'inhiber l'accumulation des réserves lipidiques, d'induire la satiété de manière directe ou en modulant l'action de plusieurs neuropeptides et d'augmenter la thermogenèse (512).

Figure 5 : Actions de la leptine



Légende :

La présence du récepteur de la leptine au niveau périphérique indique l'implication de cette hormone dans plusieurs fonctions physiologiques telles que la reproduction, la défense immunitaire, la croissance, l'hématopoïèse, le développement de la masse osseuse, thyroïdienne, la réponse au stress, la thermogenèse, l'utilisation énergétique et l'apoptose adipocytaire.

La perte de poids médiée par la leptine est due, en majeure partie, à une perte de tissu adipeux, puisque la masse musculaire est préservée (288). L'effet de la leptine se manifeste par l'inhibition de la synthèse des TG, ainsi que par l'augmentation de l'oxydation des acides gras. Cet impact est dû à son action sur les enzymes responsables du métabolisme lipidique : elle inhibe l'action de l'ACC et de la FAS, enzymes clefs dans la synthèse des acides gras. Cette inhibition conduit à une diminution des niveaux de malonyl-CoA, connu pour supprimer la CPT-1 et donc, l'oxydation des acides gras. De cette manière, la leptine dirige le métabolisme lipidique vers une diminution de la lipogenèse et vers une augmentation de l'oxydation lipidique (288, 511).

De plus, la leptine peut promouvoir la lipolyse dans les adipocytes, soit directement ou indirectement par le biais d'un facteur intermédiaire libéré par le cerveau qui pourrait agir sur les adipocytes, tel que le Cocaine and Amphetamine Regulating Transcript (CART). Il est à préciser que la lipolyse médiée par la leptine est très particulière, puisqu'elle n'est pas accompagnée par une élévation des niveaux plasmatiques d'acides gras libres (512).

En ce qui a trait au métabolisme glucidique, la leptine est responsable d'une normalisation des niveaux plasmatiques de glucose et d'insuline (512) et d'une élévation du taux de renouvellement du glucose, principalement à travers son métabolisme hépatique. Ceci se traduit par l'élévation de la captation du glucose et de la glycolyse dans le muscle ainsi que par une réduction du contenu hépatique en glycogène. Ces effets hépatiques sont exercés directement au niveau tissulaire ou indirectement, à travers les voies

neuronales et endocriniennes provenant du système nerveux central (288, 512).

En considérant ces aspects, la leptine a éte envisagée comme un traitement potentiel contre l'obésité. En ce sens, sa découverte a suscité un enthousiasme considérable au sein de la communauté scientifique, mais de nombreuses études sont encore nécessaires avant de définir, avec certitude, ses propriétés thérapeutiques. Malgré l'implication de cette hormone dans l'homéostasie métabolique, ses niveaux soutenus et élevés découplent ses actions au niveau de ses récepteurs dans l'hypothalamus, ce qui atténue les voies de signalisation qui lui permettent d'exercer ses fonctions sur la satiété et les dépenses énergétiques.

Cet aspect est bien illustré à travers certaines mutations du Ob-R, telles que celles retrouvées chez les souris db/db ou les rats obèses et spontanément diabétiques (fa/fa) qui affectent l'activité du récepteur et causent ainsi une résistance à la leptine, une obésité et une hyperinsulinémie. Bien que chez l'humain, ces mutations n'aient pas été associées aux formes communes d'obésité, l'hypothèse d'une résistance à la leptine reliée à l'obésité est maintenant bien validée (513). Plusieurs mécanismes pourraient contribuer à ce type de résistance. Premièrement, on peut citer la diminution de la capacité de la leptine à entrer dans le liquide interstitiel du cerveau, site où elle peut interagir avec les récepteurs. Un transport altéré à travers la barrière hémato-encéphalique peut donc affecter l'action de la leptine. La preuve que les sujets obèses ont des niveaux réduits de leptine dans le liquide cérébrospinal vient appuyer la théorie qu'une

insensibilité à la leptine est étroitement reliée à l'obésité. Une deuxième possibilité serait une réduction dans la transduction du signal au niveau du récepteur à la leptine, phénomène pouvant être acquis. L'activation du récepteur induit une protéine, nommée suppresseur de la signalisation des cytokines –3 (SOCS-3) mais la participation de cette dernière dans la résistance à la leptine est encore à documenter (514).

De plus, entre 5 et 10% des sujets obèses ont des taux réduits de leptine provenant d'une sécrétion anormale par le tissu adipeux. D'ailleurs, ces concentrations réduites de leptine sont reliées à une prédisposition accrue à l'obésité chez les Indiens Pima. Ces différences dans la sécrétion de leptine pourraient expliquer la variété de réponses lors de l'administration de leptine. Il est à prévoir que des effets plus prononcés seront enregistrés chez les sujets avec une hyposécrétion et l'on pourrait entrevoir des effets prometteurs lors de l'administration de leptine chez des sujets résistants, à condition de faire appel à de plus fortes doses (515). En supposant que la résistance à la leptine n'est que partielle, on peut tout de même concevoir la possibilité que, théoriquement, l'administration de leptine recombinante chez l'humain peut causer une réduction du poids corporel. Pour l'instant, les études cliniques visant à valider cette hypothèse n'ont pas été concluantes.

Au-delà des déceptions concernant l'emploi de la leptine en tant que thérapie combattant l'obésité, les chercheurs n'ont pas abandonné cette possibilité. Toutefois, une autre cible est actuellement visée : la difficulté des sujets obèses à maintenir un poids stable après une diète. En effet, une diminution des niveaux circulants de leptine pourraient être à la base de la

reprise du poids perdu et on pense que des injections de leptine seraient en mesure d'informer le cerveau du fait que les réserves adipeuses ne sont pas altérées, même si tel n'est pas le cas. Par conséquent, l'administration de leptine durant un programme de perte de poids pourrait atténuer les réponses endocriniennes compensatoires causant une augmentation de l'appétit et le regain du poids perdu. Dans ce cas, la leptine pourrait aider ces sujets à diminuer l'apport alimentaire et à maintenir un poids stable après la fin du programme d'ammaigrissement (516).

En conclusion, les données provenant de récentes études cliniques confirment que la leptine n'a pas montré d'effets thérapeutiques spectaculaires contre l'obésité, mais étant donné la nature multifactorielle de cette pathologie, l'emploi de la pharmacothérapie ne doit être considérée qu'en tant qu'adjuvant aux stratégies classiques telles qu'une diète amaigrissante ou l'exercice physique.

L'immunolocalisation des récepteurs à la leptine ainsi que de la protéine elle-même dans le tractus gastro-intestinal (517, 518) a initié de nombreuses recherches portant sur l'influence de la leptine sur le métabolisme intestinal des nutriments ainsi que sur la physiologie digestive. Bedo *et coll.* ont mis en évidence, pour la première fois, l'ARNm de la leptine et la protéine dans l'épithélium gastrique de rat, au niveau des glandes du fundus (519). Cette découverte a été suivie par la détection de la leptine et de ses récepteurs dans l'épithélium gastrique humain, plus précisément au niveau des cellules principales et pariétales (520, 521). La sécrétion de la leptine d'origine gastrique est stimulée par la prise alimentaire, la

cholécystokinine (CCK), la gastrine ou la sécrétine (511, 519). La présence de la leptine et de ses récepteurs dans la muqueuse gastrique suggère une action paracrine et/ou endocrine sur la fonction gastrique. À ce sujet, une synergie a été observée entre la leptine et la CCK dans leur effet anorexigène et on suggère ainsi que la leptine d'origine gastrique pourrait intervenir dans l'action de la CCK, notamment au niveau de l'inhibition de la prise alimentaire à court terme (519, 522, 523).

Par ailleurs, la leptine exerce une action cytoprotectrice contre les lésions gastriques en accélérant la guérison d'ulcères. Cette action protectrice est associée à des niveaux augmentés de leptine au site d'ulcération, une surexpression de facteurs de croissance tels que l'EGF, le Transforming growth factor (TGFα) et le Nerve growth factor (VGF), ainsi qu'à une forte production d'ON (522, 524). Par contre, les mécanismes sous-jacents sont encore méconnus et pourraient faire appel à une action spécifique de la leptine (525).

La présence du récepteur Ob-Rb a été également détectée au niveau de l'intestin grêle (505, 506, 526, 527). Chez l'humain, l'isoforme active du récepteur de la leptine a été localisée dans le cytoplasme, la membrane plasmatique basolatérale et la bordure en brosse des entérocytes (526).

Certaines données confèrent à la leptine un rôle de facteur de croissance pour la muqueuse intestinale, possiblement impliqué dans la carcinogenèse. En effet, la réponse trophique à la leptine se traduit par une augmentation de la masse cellulaire intestinale et par une accélération du transport des nutriments (528). Cliniquement, ceci pourrait permettre une

adaptation dans les cas de dysfonction intestinale. Dans ce sens, suite à une résection intestinale massive, l'administration de leptine engendre une réponse adaptative en augmentant l'absorption de glucides au-delà des niveaux normaux (529). Par contre, cet effet sur la morphologie intestinale dépend grandement du modèle expérimental ainsi que de la dose de leptine utilisés. En effet, l'administration de leptine a été responsable d'une réduction des lésions précancéreuses induites chimiquement au niveau de la muqueuse du côlon (530) ainsi que de l'apoptose des cellules des muqueuses iléale et jéjunale (531). En ce qui a trait aux maladies inflammatoires de l'intestin, les données sont très partagées. Les conclusions tirées dans le cadre d'études visant l'association entre la leptine et l'état anorexique très souvent constaté dans les cas d'inflammation de l'intestin s'orientent généralement vers une augmentation des niveaux plasmatiques de leptine corrélant avec le degré et la durée du processus inflammatoire (522, 532, 533).

La leptine peut également moduler le transport intestinal de certains nutriments. Malgré un nombre très restreint d'études, des données *in vitro* ont mis en évidence un effet inhibiteur sur l'absorption de glucides (518), ainsi qu'une augmentation du transport d'oligopeptides par le transporteur apical de peptides (PepT1) (534) et de l'absoption de l'acide butyrique (535).

Dans le vaste cadre de l'obésité, la lipémie post-prandiale a acquis une importance considérable et le rôle de la leptine peut s'avérer très décisif à ce niveau. En effet, l'intestin grêle représente l'interface principale entre les nutriments et milieu intérieur et l'obésité, généralement caractérisée par une

leptinémie élevée est une condition associée à une forte production de TG intestinales. Cette surproduction pourrait contribuer à l'installation ou au maintien d'une hyperlipidémie post-prandiale et d'un état d'hypertriglycéridémie, deux facteurs de risque cardiovasculaire importants. Dans ce contexte, il est donc essentiel de définir avec exactitude le rôle de la leptine dans le transport intestinal des lipides afin d'estimer la contribution de cette nouvelle hormone gastrointestinale dans la lipémie post-prandiale associée à l'obésité et au syndrome de résistance à l'insuline.

10) Description de la population et objectifs généraux

L'objectif global de l' *Enquête sociale et de santé auprès des enfants et adolescents québécois, 1999* (ESSEA 1999) est de dresser un portrait complet de la santé physique et mentale des jeunes québécois et de connaître la diversité des facteurs qui y sont associés. On y retrouve les caractéristiques individuelles du jeune, de sa famille et de son réseau d'appartenance, principalement représenté par l'école, la garderie, le réseau social et le voisinage. Cette enquête répond à un besoin urgent d'information exprimé par les intervenants et les planificateurs du milieu de la santé, puisqu'aucune autre étude de telle envergure à l'échelle du Québec et du Canada n'aborde une si vaste variété de thèmes. Ainsi, les résultats obtenus constitueront une base solide pour l'élaboration de stratégies de prévention et

d'intervention permettant un développement physique et psychologique harmonieux (536).

Mis à part les autres thèmes reliés à la santé, l'ESSEA 1999 comporte un volet nutritionnel et un volet cardiovasculaire. Le premier vise à décrire les comportements et la consommation alimentaires et à cibler les groupes à privilégier lors de l'élaboration de programmes nutritionnels (537). Le deuxième a en vue l'identification des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires et des habitudes de vie qui s'y rattachent comme les lipides sanguins, la tension artérielle, les antécédents familiaux des maladies cardiovasculaires, l'embonpoint, l'usage de la cigarette et de l'alcool, et l'inactivité physique. Ces deux volets visent deux échantillons indépendants de jeunes qui diffèrent selon les groupes d'âge, ce qui empêche, fort malheureusement, du point de vue analytique toute association entre la nutrition et la santé cardiovasculaire des jeunes.

Puisque le présent projet de doctorat a été réalisé dans le cadre du volet cardiovasculaire, la description de l'échantillon vise spécifiquement ce segment de l'enquête. Le cadre d'échantillonnage du volet cardiovasculaire comporte trois groupes de jeunes âgés de 9, 13 et 16 ans au 31 mars 1999, visant 98% de la population totale d'enfants et adolescents des âges respectifs fréquentant un établissement scolaire québécois. Toutefois, on y retrouve également les adolescents de 16 ans qui ne fréquentent plus l'école secondaire. Trois échantillons indépendants correspondant aux trois groupes d'âges ont été prélevés selon un plan stratifié à trois niveaux : le type de région administrative, la langue d'enseignement et la zone géographique et

en sélectionnant des grappes à l'intérieur de chaque école. Généralement, ces contraintes engendrent une perte de précision statistique des estimations obtenues qu'une augmentation de la taille de l'échantillon pourrait atténuer. Dans ce sens, près de 189 écoles québécoises ont été sélectionnées, pour un total d'environ 1500 jeunes par groupe d'âge.

La collecte de données a eu lieu entre janvier et mai 1999 et les instruments comportaient des questionnaires auprès des jeunes, de leurs parents et des directeurs des écoles, des mesures de la tension artérielle, des plis cutanés sous-scapulaire et tricipital, de la taille et du poids corporels, ainsi qu'un prélèvement sanguin. Les taux de réponse correspondant aux différents instruments sont de 83.4% (n=1267), 79.2% (n=1186) et 77.6% (n=1160) pour les questionnaires et les mesures anthropométriques et de 51.5% (n=783), 54.6% (n=818) et 58.5% (n=874) pour les prélèvements sanguins, au sein des groupes de jeunes de 9, 13 et 16 ans, respectivement (538).

Après l'élimination d'un certain nombre de sujets suite au refus des parents de consentir à des analyses sur les échantillons sanguins prélevés chez leur enfant, à des données manquantes ou à la présence de diabète, nous avons retenu 2249 échantillons des 2475 initialement disponibles pour l'analyse de la glycémie, de l'insulinémie, du cholestérol total, du LDL-C, du HDL-C, de l'apo B, de l'apo A-I, des TG, des acides gras libres et de la taille des particules LDL. Par contre, pour éviter toute confusion due à un mélange populationnel, nous avons restreint nos analyses génétiques à un échantillon

constitué exclusivement de Canadiens français, qui représentent 79.6% du total, pour une taille finale de 1742 sujets.

Une description détaillée des valeurs de l'IMC, de la tension artérielle, des lipides sanguins, de la glycémie, de l'insulinémie et des valeurs plasmatiques d'acides gras libres est disponible dans le rapport émis par l'Institut de la Statistique du Québec-Direction Santé Québec (536) ou dans des publications subséquentes (99, 539). En résumé, ces données révèlent une forte prévalence des valeurs limites ou élevées de la tension artérielle systolique pour tous les groupes d'âge ainsi que des valeurs moyennes de cholestérol total, de triglycéridémie et de LDL-C plus élevées chez les filles. De plus, la proportion de jeunes présentant une hypertriglyceridémie est d'avantage augmentée chez les adolescents de 13 et 16 ans. Ces données confirment également la relation entre le poids corporel et les lipides plasmatiques bien connue sous la forme d'une augmentation des TG et du LDL-C et une d'une diminution du HDL-C. Par contre, la proportion de jeunes présentant des valeurs limites ou élevées de glycémie sont faibles. On remarque toutefois une augmentation des valeurs moyennes de glycémie parallèlement au poids corporel. Tel qu'attendu, les valeurs d'insuline sont plus élevées chez les adolescents et augmentent également avec la prévalence du surpoids corporel. Finalement, les valeurs plasmatiques d'acides gras libres montrent une diminution graduelle en fonction de l'âge. Globalement, ces données suggèrent que les facteurs de risque cardiovasculaires apparaissent très tôt chez les jeunes et que les

conséquences métaboliques néfastes associées à un surpoids s'expriment également dès un âge précoce.

Cette étude est unique en soi, puisque la diversité des éléments recueillis au sein de cette population pédiatrique conduira vers une caractérisation complète du syndrome de résistance à l'insuline, ce qui permettra d'envisager, d'une part, des critères d'évaluation ou de diagnostic en utilisant un minimum de facteurs et d'autre part, des avenues thérapeutiques en mesure de prévenir les complications potentielles. Les valeurs seuil des percentiles pour définir les facteurs de risque ont été estimées à partir de la population étudiée. Elles sont majoritairement spécifiques pour l'âge et le sexe, sauf la tension artérielle qui est également spécifique pour la taille. Ces valeurs nous ont permis d'attribuer un embonpoint aux enfants ayant un IMC supérieur au $\geq 85^{ème}$ percentile. Les valeurs élevées d'insulinémie, de triglyceridémie et de tension artérielle systolique étaient celles qui dépassaient le $75^{ème}$ percentile. Des taux réduits de HDL-C impliquent une valeur inférieure au $25^{ème}$ percentile. Finalement, des valeurs glycémiques comprises entre 6.1 mmol/L et 7.0 mmol/L reflètent une glycémie à jeun altérée. Ces valeurs seuil nous ont permis d'établir une définition du syndrome de résistance à l'insuline propre à notre étude, puisque, tel que précédemment discuté, on ne dispose pas encore d'une définition bien établie de ce syndrome chez les jeunes. Ainsi, dans le cadre de notre étude, le syndrome de résistance à l'insuline a été défini comme la présence d'une hyperinsulinémie accompagnée d'au moins deux des cinq facteurs suivants: embonpoint, tension artérielle systolique élevée,

hypertriglyceridémie, des taux réduits de HDL-C et une altération de la glycémie à jeun. Ceci nous a permis d'avancer que la prévalence du syndrome de résistance à l'insuline est de 11.5 % dans notre population, avec des pourcentages variant de 10,7 à 12,2 % au sein des trois groupes d'âge (540).

Cette étude a été approuvée par les comités d'éthique de Santé Québec et de l'hôpital Ste-Justine. De plus, un consentement libre et éclairé a été obtenu auprès des jeunes et de leurs parents.

Dans le cadre de ce volet cardiovasculaire, l'objectif global de l'étude dans lequel s'inscrit mon projet de doctorat est d'examiner la contribution de différentes composantes biochimiques, physiques, génétiques, familiales et environnementales dans le développement du syndrome de résistance à l'insuline chez l'enfant et d'identifier les déterminants pouvant prédire la survenue de ce syndrome. Une partie importante de ce projet vise également l'étude de polymorphismes de plusieurs gènes en tant que gènes de susceptibilité ou modificateurs des éléments constituant le syndrome de résistance à l'insuline.

11) Objectifs spécifiques

Comme il s'agit d'un projet de grande envergure, une analyse complète n'est possible que grâce à de nombreuses collaborations. Ainsi, ma participation a visé principalement l'étude de la contribution de l'intestin dans

le syndrome de résistance à l'insuline, notamment en ce qui concerne le métabolisme lipidique. Une première partie du projet a été destinée à l'analyse de certains facteurs impliqués dans le transport intestinal des lipides tels que la I-FABP et le MTP. Pour cette partie, un parallèle a été fait entre des recherches fondamentales et épidémiologiques. Par ailleurs, j'ai procédé à une étude détaillée de la taille des particules LDL chez les jeunes Québécois et examiné, *in vitro*, l'effet de la leptine sur la synthèse et la sécrétion intestinale de lipides.

Tel que décrit précédemment, le rôle du polymorphisme Ala54Thr du I-FABP dans la pathogenèse du syndrome de résistance à l'insuline reste jusqu'à ce jour incertain. La présente étude a donc été conçue pour examiner si les variants correspondant à ce polymorphisme sont en mesure de conférer une prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline ou de modifier l'expression phénotypique associée à ce syndrome, et ce, au sein de la population pédiatrique. Étant donné le rôle central du I-FABP dans le transport intestinal des lipides, l'objectif d'une étude préalable sur une culture organotypique d'explants intestinaux de fœtus humains a été de déterminer l'effet du polymorphisme Ala54Thr sur le transport intestinal des lipides, lipoprotéines et apolipoprotéines ainsi que sur le métabolisme du glucose. Ceci nous a permis de contourner toute interférence avec les différents facteurs circulants et de préciser l'effet de ce polymorphisme sur le transport lipidique intestinal.

Puisque le MTP joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, toute modification dans l'expression de cette

protéine, telle que la variabilité génétique peut influencer le profil sécrétoire lipoprotéinique. Cependant, tout comme pour le I-FABP, le rôle du polymorphisme –493 G/T du MTP dans le syndrome de résistance à l'insuline n'est pas encore bien établi. Ainsi, le but de l'étude de ce polymorphisme dans cette population pédiatrique d'origine canadienne française est de vérifier l'impact des génotypes correspondants sur les paramètres biochimiques ou physiques caractérisant le syndrome de résistance à l'insuline et d'examiner leur implication dans cette pathologie.

Malgré l'abondance de données concernant la morphologie, l'ultrastructure, le développement et les changements fonctionnels de l'intestin fœtal humain, les événements impliqués dans la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines demeurent partiellement obscurs. Afin d'élucider cet aspect, nous avons également examiné le profil ontogénique, la distribution et la régulation par les composantes lipidiques du MTP dans des explants intestinaux de fœtus humains. Les hypothèses sous-jacentes à cette analyse stipulent que l'intestin fœtal humain exprime le MTP, étant donné sa capacité à synthétiser et à secréter des lipoprotéines contenant l'apo B, telles que les chylomicrons et les VLDL et qu'une faible activité du MTP serait à l'origine d'une réduction de l'assemblage des particules lipoprotéiques dans le côlon fœtal humain.

En outre, même si l'hypothèse concernant l'implication du MTP dans les étapes d'initiation et d'assemblage de la particule lipoprotéique devient de plus en plus acceptée, le processus et le site exact de transfert des lipides reste à déterminer. Dans ce sens, une partie de nos recherches ont permis

identifier d'autres sites intracellulaires susceptibles de contenir le MTP ainsi que d'évaluer le degré d'association entre le MTP, le PDI et l'apo B, indiquant la présence concomitante du MTP actif et de la particule lipoproteinique au sein de ces compartiments. Les spécimens intestinaux utilisés pour cette partie de l'étude proviennent du ligament de Treitz et ont été prélevés chez des rats Sprague Dawley.

La place qu'occupe le cholestérol LDL dans la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires est aujourd'hui bien connue. Cependant, il ne représente pas l'unique facteur, puisque les concepts actuels affirment qu'un ensemble d'altérations métaboliques seraient à la base de ces pathologies et que la qualité, au même titre que la quantité des particules LDL est un important déterminant du risque athérosclérotique. À ce sujet, une vaste littérature nous informe sur l'étroite relation entre les particules LDL petites et denses et la dyslipidémie caractérisant certaines maladies cardiovasculaires ou la résistance à l'insuline. Par conséquent, dans le cadre de notre enquête visant la caractérisation en profondeur du syndrome de résistance à l'insuline chez l'enfant, la détermination de la taille des particules LDL s'avère incontournable. Les objectifs spécifiques de cette partie étaient donc de décrire la distribution des valeurs de la taille des particules LDL puisque la littérature dispose de très peu d'informations concernant cette donnée dans la population pédiatrique, de caractériser l'association entre la taille des particules LDL et les variables lipidiques, glucidiques ou anthropométriques et de mettre en relation les LDL petites et denses avec l'obésité, l'insulino-résistance et le syndrome de résistance à

l'insuline. Comme la mesure de la taille des particules LDL requiert une méthodologie rigoureuse et assez laborieuse, nous avons également exploré la possibilité d'identifier des rapports indirects construits à partir de variables biochimiques disponibles dans un bilan lipidique classique, susceptibles de remplacer une analyse directe. Avant de procéder à l'analyse principale, nous avons effectué une étude préliminaire, dont le rapport est présenté en annexe de cet ouvrage servant à tester plusieurs procédures destinées à assurer une qualité irréprochable des mesures de la taille des particules LDL et à nous guider lors de la détermination de cette valeur dans l'ensemble de l'échantillon.

Nombre de résultats font état de la présence de récepteurs fonctionnels de la leptine dans le tractus gastro-intestinal, mais les données concernant le rôle exact de cette protéine dans la biogenèse des composés lipidiques dans l'intestin sont très limitées. Le but de cette dernière partie du projet consistait donc à examiner la synthèse et la sécrétion de lipides, de lipoprotéines et d'apos dans le modèle intestinal des cellules Caco-2, et de localiser avec précision les récepteurs Ob-Rb dans cette même lignée cellulaire.

ARTICLES

Premier article:

THE POLYMORPHISM AT CODON 54 OF THE FABP2 GENE INCREASES FAT ABSORPTION IN HUMAN INTESTINAL EXPLANTS

Pour la réalisation de cette publication, j'ai procédé au génotypage se rapportant aux deux polymorphismes et participé à la rédaction de l'article, sous la supervision du Dr Levy

Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(43), 39679-84

THE POLYMORPHISM AT CODON 54 OF THE FABP2 GENE INCREASES FAT ABSORPTION IN HUMAN INTESTINAL EXPLANTS

Emile Levy[1], Daniel Ménard[2], Edgard Delvin[4], Simona Stan[1], Grant Mitchell[3], Marie Lambert[3], Ehud Ziv[5], Juan Carlos Feoli-Fonseca[3], and Ernest Seidman[3]

Departments of Pediatrics[3], Biochemistry[4] and Nutrition[1], Université de Montréal, Department of Anatomy and Cellular Biology[2], Université de Sherbrooke, Québec, Canada, and Diabetes Unit[5], Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

Running title: I-FABP polymorphisms and intestinal fat transport

Address for correspondence: Dr. Emile Levy
Hôpital Sainte-Justine

ABSTRACT

Based on titration microcalorimetry and Caco-2 cell line transfection studies, it has been suggested that the A54T of the FABP2 gene plays a significant role in the assimilation of dietary fatty acids. However, reports were divergent with regard to the *in vivo* interaction between this polymorphism and postprandial lipemia. We therefore determined the influence of this intestinal fatty acid-binding protein polymorphism on intestinal fat transport using the human jejunal organ culture model, thus avoiding the interference of various circulating factors capable of metabolizing *in vivo* postprandial lipids. Analysis of DNA samples form 32 fetal intestines revealed 22 homozygotes for the wild-type Ala 54/Ala 54 genotype (0.83) and 10 heterozygotes for the polymorphic Thr 54/Ala 54 genotype (0.17). The Thr-encoding allele was associated with increased secretion of newly esterified triglycerides, augmented *de novo* apolipoprotein B synthesis and elevated chylomicron output. On the other hand, no alterations were found in very low density lipoprotein and high density lipoprotein production, apolipoprotein A-I biogenesis, or microsomal triglyceride transfer protein mass and activity. Similarly, the alanine to threonine substitution at residue 54 did not result in changes in brush border hydrolytic activities (sucrase, glucoamylase, lactase, alkaline phosphatase) or in glucose uptake or oxidation. Our data clearly document that the A54T polymorphism of FABP2 specifically influences small intestinal lipid absorption, without modifying glucose uptake or metabolism. It is proposed that, in the absence of confounding factors such as environmental and genetic variables, the FABP2 polymorphism has an

important effect on postprandial lipids *in vivo*, potentially influencing plasma levels of lipids and atherogenesis.

INTRODUCTION

The intestine is the site essential for the transport of alimentary fat in the form of lipoproteins. After the digestive phase, the lipolytic products are absorbed by the enterocyte, in which a complex series of sequential events result in their packaging as chylomicrons (1-3). The formation and secretion of chylomicrons are key steps in the transport of dietary fats and fat soluble vitamins (4,5). The assembly of these triglyceride-rich lipoproteins within the enterocyte is a multistep pathway including the uptake and translocation of lipolytic products from the brush border membrane to the endoplasmic reticulum by fatty acid-binding proteins (FABP), lipid esterification, synthesis and posttranslational modification of different apolipoproteins, as well as the packaging of lipid and apolipoprotein components into lipoprotein particles (1-6).

Intestinal FABP (I-FABP) is a small cytosolic protein involved in intracellular fatty acid (FA) transfer and metabolism (7). However, its specific function remains unclear. It is encoded by the FABP2 gene, located in the long arm of chromosome 4 (8,9). The G to A polymorphism of codon 54 of the FABP2 gene results in the substitution of a Thr (mutated-type) in I-FABP (10). This Thr variant exhibits a 2-fold greater affinity for long-chain FA compared to Ala-containing I-FABP (wild-type) *in vitro* (10). *In vivo* studies reveal that the Thr-encoding allele is associated with insulin resistance and enhanced fat

oxidation rates among Pima Indians, a group known to have the highest prevalence of type 2 diabetes mellitus (10,11). A similar association observed among aboriginal Canadians between the Thr-54 I-FABP allele and elevated plasma triglycerides supports the hypothesis that this polymoprhism is related to an increased affinity to dietary long-chain FA and enhanced intestinal lipid uptake (12). This same polymorphism was further associated with increased fat transport in Caco-2 cells (13) and postprandial lipemic response (14). Nevertheless, other reports did not confirm the role of the Thr-54 allele in lipid and glucose metabolism. The same mutation in a Finnish population had no impact on the FA composition of plasma lipids, the basal metabolic rate, or the insulin, glucose and lipid levels (15-17). Moreover, the increased lipid oxidation and postprandial response associated with the Thr 54 allele may be due to various confounding *in vivo* factors, including insulin resistance, fasting triglyceride concentrations, and various polymorphisms of apo E, apo C-II, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein (16,18-20). Additionally, the Ala-to-Thr shift in I-FABP may alter the amount of absorbed FA transported by the portal route to the liver (21). Finally, recent experimental studies in mice and using Caco-2 cells have suggested that I-FABP is not essential for dietary fat absorption (22,23).

The aim of our study was to investigate the relationship between polymorphisms of I-FABP and intracellular lipid transport in the human intestine. We also sought to determine how the Thr-encoding allele influences lipid esterification, *de novo* synthesis of apolipoproteins A-I and B and the secretion of lipoproteins, as well as glucose uptake and metabolism. To

address these issues *in vitro*, we utilized organ culture of human intestine with fetal explants. This represents a unique experimental model to further our understanding of the complex biosynthetic molecular events essential to the formation and secretion of lipoproteins in the human intestine (24-28). Thus, the intestine organ culture model affords the opportunity to investigate the functional role of polymorphisms of I-FABP while minimizing the influence of the many confounding factors seen in the *in vivo* situation, thus facilitating the interpretation of data.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

Intestinal tissue was obtained from 32 normal fetuses at 17-20 weeks of gestation after elective pregnancy terminations. No specimens were collected from cases associated with any congenital abnormalities or fetal deaths. Studies were approved by the institutional Human Subject Review Board. The entire small intestine was immersed in Leibovitz L-15 medium containing garamycin (40 µg/ml) and transported immediately to the laboratory at room temperature. The proximal half of the intestine excluding the first 3 cm was used and defined as jejunum.

Intestinal Organ Cultures

The jejunum was cleansed of mesentery, split longitudinally, washed in culture medium, and cut into explants (3 x 7 mm). An average of 10-15

explants were randomly transferred onto a lens paper and placed mucosal side up into each organ culture dish (Falcon Plastics, Los Angeles, CA). Six dishes were used for each experimental condition. 0.8 ml of Leibovitz L-15 medium was added to the central well of each culture dish, a volume sufficient to dampen the tissue without immersing it (29). Explants were cultured in serum-free L-15 medium as we described previously (25,30,31). After an initial 3 h stabilization period, the medium was refreshed with a final concentration of 1.0 µmol/ml unlabeled oleic acid with 0.3 µCi of [^{14}C]-oleic acid (specific activity 53.9 mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) (25-28). Explants originating from each fetus were genotyped for the FABP2 A54T polymorphism (10). Lipid analyses were carried out on both the tissue and culture media. The morphological integrity of the jejunal explants was confirmed at the onset and after 5 days of culture, as described previously (31).

Lipid Carrier

In order to provide a carrier for lipoproteins synthesized *in vitro*, postprandial plasma was obtained from healthy volunteers 3h after the ingestion of fat (50 g/1.73m^2), as we described previously (25-28).

Isolation of lipoproteins

After incubation, the explants were homogenized in isotonic saline containing antibacterial and antiprotease agents (0.01% sodium azide, 0.1%, EDTA and 10.000 (kallitrein inactivating units (kiu)/ml Trasylol) . The medium

was mixed with the plasma lipid carrier (2:1, v/v), and the lipoproteins were isolated by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman Instruments Inc., Montreal, Canada), as described previously (25,32). Briefly, after the removal of the 0.97 g/ml density fraction by centrifugation using a TLS 55 rotor (20,000 rpm for 20 min), lipoproteins with density <1.006 g/ml were separated by spinning at 100,000 x g for 2.26 h with a TL 100.3 rotor at 5°C. The high density fraction was obtained by adjusting the infranatant to a density of 1.21 g/ml and by centrifugation for 6.5 h at 100,000 rpm. Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed against 0.15 M NaC and 0.001 M EDTA, pH 7.0, at 4°C for 24 h.

De novo apolipoprotein synthesis

After the incubation period in the presence of unlabeled oleic acid to stimulate the synthesis of lipids and apoproteins, jejunal explants were washed twice with methionine-free Leibovitz medium. They were then incubated in the same medium containing unlabeled oleic acid for 60 min at 37°C in the presence of [^{35}S]-methionine (300 µCi/ml; specific activity 1,062 Ci/mmol) (27,28,33). At the end of the labeling period, explants were washed three times and homogenized in phosphate-buffered saline (20 mM sodium phosphate and 145 mM NaCl, pH 7.4) containing 1% (wt/v) Triton X-100, 2 mM methionine, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM benzemidine. Aliquots of tissue homogenates were then treated with 20% trichloroacetic acid, and the protein precipitates were washed three times with 5%

trichloroacetic acid. The radioactivity was then determined using a liquid scintillation spectrometer (Beckman Instruments Inc.). Another aliquot of the homogenate was also centrifuged (4°C) at 105,000 x g for 60 min in a 50-Ti rotor (Beckman Instruments Inc.) to determine apolipoprotein levels. The immunoprecipitation of apo-A-I and apo-B was then carried out on supernatants with excess specific monoclonal antibodies (Roche Molecular Biochemicals). Pansorbin (Calbiochem, San Diego, CA) was then added, and the mixture was reincubated at 20°C for 60 min. The immunoprecipitate was washed extensively and analyzed by a linear 4-20% acrylamide gradient preceded by a 3% stacking gel, as described previously (27,28,33). Gels were sectioned into 4 mm slices and counted after an overnight incubation at 20°C with 1 ml of BTS-450 (Beckman Instruments Inc.) in 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready solvent; Beckman Instruments Inc.).

FABP2 polymorphisms

DNA from intestinal explants was isolated (34) and genotyping was performed by RFLP. A 228-bp DNA fragment containing the A54T polymorphism was amplified using the following primers: 5' CAC TTC CTA TGG GAT TTG ACT 3' and 5' TAC CCT GAG TTC AGT TCC GTC 3'. The polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a 25 µl reaction volume containing 2 µmol/L of each primer, 200µmol/L dNTP (Pharmacia), 1 mmol/L $MgCl_2$, 2 U Taq DNA polymerase (Gibco-BRL), 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 and 100 ng genomic DNA. After an initial 5 min denaturation at 95°C,

amplifications were carried out for a total of 30 cycles: 94°C, 45 sec; 55°C, 60 sec; 72°C, 45 sec; and completed with a final 7 min extension at 72°C. To detect Ala54Thr polymorphism, the PCR products were digested with Hha1 restriction enzyme (Gibco- BRL) as described by Baier *et al.* (10).

RT-PCR analysis

After incubating explants in the presence of unlabeled oleic acid, RNA was extracted and amplified by PCR in order to determine apo B and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA. All these techniques were described in detail previously (28).

Lipid analyses

Aliquots of explant homogenates and their respective incubation media were lipid-extracted with chloroform-methanol 2:1 (v/v) (36). Small amounts of lipid standards were added to the samples before separation of individual lipid classes by one-dimensional silica gel TLC (Eastman Kodak, Co.), as described previously (25,37). The nonpolar solvent system was hexane:diethylether:glacial acetic acid (80:20:3) (v/v/v). The radioactivity of the separated fractions was measured using a liquid scintillation spectrometer. Quenching was corrected using computerized curves generated with external standards. An aliquot of the tissue homogenate was used for protein determinations (38). The hydrolytic activities of sucrase, glucoamylase, lactase and alkaline phosphatase of cultured explants were assayed as described by Ménard et al (31). Glucose oxidation was measured

by incubating jejunal explants with D-[U-^{14}C] glucose (specific activity) and collecting $^{14}CO_2$ by soaking paper rolls in hyamine hydroxyde (39). The activity and mass of intestinal microsomal triglyceride transfer protein (MTP) were evaluated as described previously (40).

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of I-FABP polymorphisms among the 32 intestinal specimens revealed 22 homozygotes for the FABP2 Ala54/Ala54 genotype, 1 homozygote for the Thr/Thr genotype and 9 heterozygotes for the FABP2 Thr54/Ala54 genotype. Thus, the frequencies of the alanine-encoding (Ala 54) and threonine-encoding (Thr 54) FABP2 alleles were determined to be 0.83 and 0.17, respectively. Similar prevalences were observed in Caucasians and among Pima Indians (10,14,15). Because only one subject was found to be homozygous for the Thr-54 allele, his data were pooled with those of Thr-54/Ala-54 heterozygotes. Subsequent experiments were carried out to determine whether the alanine to threonine substitution in the FABP2 gene product results in altered intestinal lipid transport.

The incorporation of labeled oleic acid by intestinal explants was used to quantify the rate of synthesis of total lipids as well as the specific lipid classes. As shown in Figure 1, lipid synthesis was significantly greater in explants expressing the Thr-54 I-FABP variant. Analysis of the different lipid classes by TLC revealed that triglyceride and phospholipid esterification was significantly augmented (~16% and 35%, respectively) in jejunal explants with the Thr54-containing I-FABP compared with wild-type jejunal explants (Figure

2*A*). Similarly, the secretion of labeled triglycerides was higher (~41%) in the medium of the heterozygous I-FABP tissue (Figure 2*B*). No significant variations were noted in phospholipid and cholesteryl ester export. When lipid composition was assessed as a percentage of total lipid distribution, no significant differences were noted between the two groups (Table I). Overall, our findings suggest that the expression of Thr/Ala I-FABP is characterized primarily by an increased synthesis and secretion of triglycerides, the major class of dietary lipids.

Experiments were also conducted to examine the impact of the I-FABP polymorphism on the transport of newly synthesized lipids by lipoproteins. Culture supernatants were collected and immediately ultracentrifuged to separate chylomicrons, very low density lipoproteins and high density lipoproteins. As expected from the aforementioned lipid data, alterations in lipoprotein exocytosis were found in association with the Thr-encoding allele (Figure 3). The secretion of chylomicrons, the predominant lipoprotein fraction incorporating [^{14}C]-oleic acid, was greater in jejunal explants with Thr-containing I-FABP than in those with Ala-containing I-FABP. very low density lipoprotein and high density lipoprotein production was not significantly different between tissues with the Thr- and Ala-encoding allele of the FABP2 gene. Our data thus suggest that chylomicrons are the predominant lipoprotein particles, which are influenced by the I-FABP polymorphism.

The next set of experiments was designed to examine the effect of I-FABP polymorphism on the process of apolipoprotein biogenesis. Their synthesis was estimated by the incorporation of [^{35}S]-methionine, with

subsequent immunoprecipitation and separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Incubation of jejunal I-FABP polymorphic explants with [^{35}S]methionine resulted in increased apolipoprotein synthesis and secretion of apo B-48 and apo B-100, whereas the magnitude of apo A-I production was not modified by the Ala-to-Thr shift in I-FABP (Table II). To determine whether the increase in apo-B synthesis associated with FABP2 gene polymorphism was related to augmented apo-B mRNA expression, reverse transcription-PCR analysis was performed. No significant effect of the I-FABP polymorphism was noted on the abundance of apo-B mRNA (Fig. 4), because the relative apo-B mRNA levels (expressed as average ratio values in apo mRNA:glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA) in three experiments were similar between Thr-54 carriers and Ala-54 homozygotes (0.96±0.11 *versus* 1.07±0.13, respectively). This suggests that co-translational and posttranslational mechanisms may be responsible for the regulation of apo B formation in the presence of Thr-containing I-FABP. An extensive body of literature suggests that apo B mRNA levels are relatively stable and generally do not change under conditions that alter extracellular apo B secretion (27,28,41-43). On the other hand, there is evidence that intracellular degradation of apo B is the major regulatory event for TG-rich lipoprotein secretion. The stabilization phase necessary for the correct folding of translocating apo B and its assembly with TG-rich lipoproteins requires a bulk transfer of lipid to apo B (44-46). Otherwise, apo B is misfolded and is probably degraded via the ubiquitin-dependent proteasomal pathway (47-49). It is therefore conceivable that the changes in protein properties caused by

the I-FABP polymorphism result in more efficient conveyance of fatty acids to the endoplasmic reticulum, which preserves apo B form degradation. Accordingly, the threonine-containing I-FABP has been shown to possess higher affinity for long-chain fatty acids (10). Therefore, we can speculate that the alanine to threonine substitution at residue 54 facilitates the cytoplasmic attachment of fatty acids and their fast release to the endoplasmic reticulum where they undergo esterification to TG, resulting in both apo B protection from proteolytic degradation and enhanced chylomicron formation, as suggested by our data.

The small intestinal enterocyte contains two distinct FABPs, liver FABP and I-FABP, which are 29% homologous (1). To determine whether their abundance is altered by Ala-to-Thr shift in FABP, two intestinal specimens were submitted to Western analysis. Although I-FABP polymorphic explants produced more triglycerides (38%) and chilomicrons (31%) than wild-type explants, no marked differences were noted in I-FABP and L-FABP levels (Fig. 5), thus suggesting the involvement of I-FABP functional properties in the magnitude of fat absorption. This is consistent with the findings of Baier *et al.* (10), whose observations indicate that Thr-54 substitution in I-FABP occurs in a region of the molecule involved in fatty acid binding that could alter its overall stability, ligand affinity, or the kinetics of fatty acid acquisition/release. As mentioned before, the extended affinity could be expected to enhance intestinal fat absorption by increasing intracellular fatty acid trafficking and processing by the secretory pathway. However, other mechanisms are possible since additional functions have been suggested for

FABP, including targeting fatty acids to intracellular organelles and different metabolic pathways, stimulating the activities of specific protein enzymes associated with FA metabolism (microsomal glycerol 3-phosphate acyltransferase and lysophosphatidyl acyltransferase), protecting intracellular polyunsaturated fatty acids against peroxidation, and regulating signal transduction pathways (50). Nevertheless, the use of a very limited number of specimens in our studies emphasizes the need for careful characterization of cellular I-FABP and L-FABP in relation to FABP genotype to validate our data and draw definitive conclusions about the mechanisms involved in intestinal fat transport.

MTP resides in the endoplasmic reticulum in tissues secreting apo B-containing lipoproteins. Absence of the functional MTP causes abetalipoproteinemia, a recessive disease characterized by a deficiency in the assembly process and secretion of TG-rich lipoproteins into plasma (51). Given its critical role in the formation of apo B-containing lipoproteins, we determined the protein mass and activity of MTP in intestinal tissues with Thr-containing I-FABP and Ala-containing I-FABP (Fig. 6). However, the Ala to Thr shift did not alter MTP mass. MTP activity in the intestinal explants was then estimated by monitoring the transfer of triglyceride from donor to acceptor vesicles. No marked changes were noted in MTP activity between I-FABP wild-type and polymorphic tissues. It seems therefore that the ability of Thr-encoding allele to enhance enterocyte fat transport is due to the stimulation of triglyceride synthesis, the mechanism likely involving apo-B protection.

The ability of I-FABP to influence intestinal carbohydrate metabolism was also investigated in the present studies. The evaluation of brush border disaccharidase hydrolytic activities and glucose metabolism did not reveal any significant differences between mutant and wild-type I-FABP intestinal specimens (Table III). The uptake and oxidation of glucose by these tissues was comparable, as shown by quantification of CO_2 production from [U-^{14}C] glucose, and was not influenced by I-FABP polymorphism (Table III).

Our observations stress the potential impact of I-FABP polymorphisms on the biosynthetic events involved in the formation and secretion of lipoproteins. Individuals endowed with the Thr -54 gentoype are presumed to express augmented intestinal absorption and elevation of plasma postprandial chylomicron concentrations in response to dietary long-chain fatty acids. However, such an association has not been validated in a certain number of *in vivo* studies (15-17). One may thus suspect that other mechanisms involved in plasma lipid clearance may obscure the relationship between I-FABP variants and intestinal fat contribution. Common genetic variants influence the lipolytic process and receptor removal pathway of TG-rich lipoproteins (18-20, 52, 53). These determinants include lipoprotein lipase, apo E, apo C-II and B/E receptor that can modulate chylomicron degradation and remnant uptake, thereby altering their clearance from the circulation. The increased availability of free fatty acids via chylomicron degradation in the peripheral circulation of subjects with I-FABP polymorphism may affect intermediary metabolism. It has been reported (54) that high plasma concentrations of free fatty acids decrease the rate of

insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, resulting in a compensatory increase in plasma insulin concentrations. Chronically, this situation leads to insulin resistance, as documented in the Pima Indians, a native population of the American Suthwest with an extraordinarily high frequency of type 2 diabetes (10). The same I-FABP polymorphism was associated with a defect in postprandial lipemia (14) and other dyslipidemias (55). Recently, I-FABP has also been suggested to physiologically function as a lipid-sensing component of energy homeostasis (22). Our studies here provide further evidence that polymorphisms in I-FABP are not silent genetic markers; rather, they likely play a key role in lipid production and metabolism.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Total radiolabeled lipid content in tissue and medium of jejunal organ cultures. Jejunal explants were incubated with [^{14}C]-oleic acid substrate for 4 h. Lipids of tissue homogenates and media of wild-type and polymorphic intestinal specimens were then extracted with 2:1 (vol/vol) chloroform-methanol and quantitated. Values are means ± S.E. of 22 wild-type (Ala/Ala □) and 10 polymorphic (Thr/Ala ■) fetal intestines.*, $p<0.01$, **, $p<0.005$

Figure 2: Incorporation of [^{14}C]-oleic acid substrate into lipid classes. Jejunal fetal explants were incubated with [^{14}C]-oleic acid substrate for 4h. Lipids of tissue homogenates (*A*) and media (*B*) were then extracted, isolated by TLC, and counted. Values represent the means ± S.E. of 22 wild-type (Ala/Ala □) and polymorphic (Thr/Ala ■) specimens.*, $p<0.05$, **, $p<0.01$

Figure 3: Levels of lipoproteins isolated from the media of jejunal explants. After the incubation of jejunal explants with [^{14}C]-oleic acid, lipoproteins were separated by ultracentrifugation. *CM*, chylomicrons; *VLDL*, very-low-density lipoproteins; *HDL*, high-density lipoproteins. Ala/Ala □; Thr/Ala ■. Values are the means ± S.E. of three experiments and are expressed as dpm/mg tissue protein. *, $p<0.005$.

Figure 4: Effect of I-FABP polymorphism on apo B transcript levels in fetal intestines. Jejunal explants from 16 to 19-week-old fetuses were incubated with unlabeled oleic acid, and apo-B and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA was determined by reverese transcription-PCR analysis. Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was reported as the housekeeping gene.

Figure 5: Effect of I-FABP polymorphism on protein mass of I-FABP and L-FABP. Jejunal explants were immunoprecipitated with specific anti-I-FABP and L-FABP antibodies. The immunoprecipitates were run on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane, which was blotted with I-FABP and L-FABP antibodies. There was no consistent differences in the expression of I-FABP and L-FABP between wild-type (lanes 1,3) and polymorphic (lanes 2,4) specimens.

Figure 6: Effect of I-FABP polymorphism on protein mass and activity of MTP. Jejunal explants were immunoprecipitated with anti-MTP antiserum. The immunoprecipitates were run on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane, which was blotted with anti-MTP large subunit MTP (A). MTP activity is illustrated in B.

REFERENCES

1) Davidson, N.O., and Magun, A.M. (1993) *Textbook of gastroenterology*, Yamada, T., Alpers, D.H., Owyang, C., Powell, D.W., and Silverstain, F.E., editors. Lippincott, Phyladelphia, 428-455

2) Tso, P, and Balint, J.A. (1986) *Am. J. Physiol.* 250, G715-G726

3) Levy, E. (1996) *Clin. Invest. Med.* 19, 317-324

4) Black, D.D. (1995) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20, 125-147

5) Field, F.J., and Mathus, S.N. (1995) *Prog. Lipid Res.* 34, 185-198

6) Levy, E., Mehran, M., and Seidman, E. (1995) *FASEB J.* 9, 626-635

7) Sweetser, D.A., Heuckeroth, R.O., and Gordon, J.I. (1987) *Annu. Rev. Nutr.* 7, 337-359

8) Lowe, J.B., Sacchettini, J,C., Laposata, M., McQuillam, J.J., and Gordon, J.I. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 5931-5937

9) Cohn, S.M., Simon, T.C., and Roth, K.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 119, 27-44

10) Baier, L.J., Sacchettini, J.C., Knowler, W.C., Eads, J., Paolisso, G., Tataranni, P.A., Hisayoshi, M., Bennett, P.H., Bogardus, C., and Prochazka, M. (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 1281-1287

11) Knowler, W.C., Pettitt, D.J., Saad, M.F., and Bennett, P.H. (1990) *Diabetes/Metab. Rev.* 6, 1-27

12) Hegele, R.A., Connelly, P.W., Hanley, A.J.G., Sun, F., Harris, S.B., and Zinman, B. 1997 *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1060-1066

13) Baier, L.J., Bogardus, C., and Sacchettini, J.C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10892-10896

14) Agren, J.J., Valve, R., Vidgren, H., Laakso, M., and Uusitupa, M. (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1606-1610

15) Sipiläinen, R., Uusitupa, M., Heikkinen, S., Rissanen, A., and Laakso, M. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2629-2632

16) Jeppesen, J., Holleebeck, C.B., Zhou, M.-Y., Coulston, A.M., Jones, C., Chen, Y.-D.I., and Reaven, G.M. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 320-324

17) Vidgren, H.M., Sipiläinen, R.H., Keikkinen, S., Laakso, M., and Uusitupa, M.I.J. (1997) *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 405-408

18) Berg, K. (1990) *Acta. Genet. Med. Gemellol (Roma)* 39 15-24

19) Ordovas, J.M., and Schaefer, E.J. (2000) *Br. J. Nutr.* 83, S127-S136

20) Schrezenmeier, J., Keppler, I., Fenselau, S., Weber, P., Biesalski, H.K., Probst, R., Laue, C., Zuchhold, H.D., Prellwitz, W., and Beyer, J. (1993) *Ann. NY Acad Sci* 683, 302-314

21) Mansbach, C.M. II, and Dowell, R.F. (1993) *Am. J. Physiol.* 264 G1082-G1089

22) Vassileva, G., Huwyler, L., Poirier, K., Agellon, L.B., and Toth, M.J. (2000) *FASEB J.* 14, 2040-2046

23) Darimont, C., Gradoux, N., Persohn, E., Cumin, F., and De Pover, A. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 84-92

24) Levy, E., and Ménard, D. (2000) *Micros. Res. Tech.* 49, 363-373

25) Levy, E., Thibault, L., and Ménard, D. (1992) *J. Lipid Res.* 33, 1607-1617

26) Levy, E., Thibault, L., Delvin, E., and Ménard, D. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 1340-1345

27) Levy, E., Loirdighi, N., Thibault, L., Nguyen, T.D., Labuda, D., Delvin, E., and Ménard, D. (1996) *Am. J. Physiol.* 270, G813-G820

28) Levy, E., Sinnett, D., Thibault, L., Nguyen, T.D., Delvin, E., and Ménard, D. (1996) *FEBS Lett.* 393, 253-258

29) Ménard, D., and Arsenault, P. (1985) *Gastroenterol.* 88, 691-700

30) Loirdighi, N., Ménard, D., and Levy, E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1175, 100-106

31) Ménard, D., Arsenault, P., and Pothier, P. (1988) *Gastroenterol.* 53, 319-326

32) Loirdighi, N., Ménard, D., Delvin, D., and Levy, E. (1997) *J. Cell. Biochem.* 66, 65-76

33) Levy, E., Marcel, Y., Deckelbaum, R.J., Milne, R., Lepage, G., Seidman, E., Bendayan, M., and Roy, C.C. (1987) *J. Lipid Res.* 28, 1263-1274

34) Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988) *Nucleic Acid Res.* 16, 1215

35) Syvänen, A.C., Sajantila, A., and Lukka, M. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* 52, 46

36) Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497-509

37) Levy, E., Beaulieu, J.-F., Delvin, E., Seidman, E., Yotov, W., Basque, J.-R., and Ménard, D. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 12-22

38) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

39) Kalderon, B., Gutman, A., Levy, E., Shafrir, E., and Adler, J.H. (1986) *Diabetes* 35, 717-724

40) Levy, E., Stan, S., Garofalo, S., Delvin, E.E., Seidman, E.G., and Ménard, D. (2001) *Am. J. Physiol.* 280, G563-G571

41) Dashti, N., Williams, D.L., and Alaupovic, P. (1989) *J. Lipid Res.* 30, 1365-1373

42) Dixon, J.L., Furukawa, S., and Ginsberg, H.N. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 5080-5086

43) Pullinger, C.R., North, J.D., Teng, B.B., Rifici, V.A., Ronhild de Brito, A.E., and Scott, J. (1989) *J. Lipid Res.* 30, 1065-1077

44) Yao, Z., Tran, K., and McLeod, R.S. (1997) *J. Lipid Res.* 38,1937-1953

45) Boren, J., Graham, L., Wettesten, M., Scott, J., White, A., and Olofsson, S.O. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 9858-9867

46) Taghibiglou, C., Rudy, D, Van Iderstine, S.C., Aiton, A., Cavallo, D., Cheung, R., and Adeli, K. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 499-513

47) Yeung, S.J., Chen, S.H., and Chan, L. (1996) *Biochemistry* 35, 13843-13848

48) Fisher, E.A., Zhou, M., Mitchell, D.M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A.L., and Ginsberg, H.N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20427-20434

49) Chen, Y., Le Caherec, F., and Chuck, S.L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 11887-11894

50) Dutta-Roy, A.K. (2000) *Cell. Mol. Life Sci* 57, 1360-1372

51) Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J., and Gregg, R.E. (1992) *Science* 258, 999-1001

52) Dallongeville, J., Roy, M., Leboeuf, N., Xhigness, M., Davignon, J., and Lussier-Cacan, S. (1991) *Arterioscler. Thromb.* 11, 272-278

53) Wittekoek, M.E., Pimstone, S.N., Reymer, P.W., Feuth, L., Botma, G.J., Defesche, J.C., Pins, M., Kayden, M.R., and Kastelein, J.J. (1998) *Circulation* 97, 729-735

54) Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J.V., and Rossetti, L. (1994) *J. Clin. Invest.* 93, 2438-2446.

55) Pihlajamaki, J., Rissanen, J., Heikkinen, S., Karjalainen, L., and Laakso, M. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1039-1044

Table 1: Lipid composition of jejunal explants and their incubation medium

	PL	MG	DG	FC	TG	CE	FFA
	% composition						
Tissue							
Ala/Ala	37.1±2.0	0.49±0.1	3.2±0.3	0.7±0.2	50.8±0.6	2.5±0.3	5.4±0.6
Thr/Ala	39.37±1.1	0.54±0.1	2.5±0.4	0.4±0.1	50.2±0.8	2.5±0.7	4.9±0.6
Medium							
Ala/Ala	9.8±0.2	3.3±0.2	4.5±0.32	4.0±0.6	74.5±2.9	4.0±0.6	—
Thr/Ala	6.5±0.2	1.6±0.3	3.9±0.33	2.5±0.2	81.5±1.1	4.0±0.4	—

Jejunal explants were incubated with [^{14}C]-oleic acid substrate for 4 h. Lipid classes in tissue homogenates and their media were then extracted with chloroform-methanol (2:1), isolated by TLC and quantitated as described under "Materials and Methods". Results represent the percentage of total ^{14}C-lipid distribution.

Abbreviations: PL, phospholipid; MG, monoacylglycerol; DG, diacylglycerol; FC, free cholesterol; FFA, free fatty acid; TG, triacylglycerol; CE, cholesteryl ester.

Table 2: Synthesis of apolipoproteins A-I and B by cultured jejunal explants.

Apolipoproteins	Ala/Ala	Thr/Thr
Tissue		
B-100	0.085±0.019	0.099±0.022
B-48	0.145±0.025	0.178±0.034
A-I	0.264±0.045	0.287±0.036
Medium		
B-100	1.963±0.183	2.585±0.216*
B-48	2.192±0.204	3.002±0.187*
A-I	2.520±0.197	2.991±0.272

Fetal jejunal explants were incubated with [^{35}S]-methionine in the presence of unlabeled oleic acid for 60 min to stimulate the biogenesis of apolipoproteins. At the end of the labeling period, explants were washed, homogenized, and centrifuged. Supernatants from the cell homogenates and concentrated media were then reacted with excess antibodies for 18 h at 4°C to precipitate specific apolipoproteins. Immune complexes were washed and analyzed by linear 4-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, gels were sliced and counted for radioactivity. Data represent the means ± S.E. of five specimens in each group and are expressed as the percentage of trichloroacetic acid-precipitable proteins/mg tissue protein. * $p<0.05$

Table 3: Activity of intestinal brush border enzymes and glucose metabolism in cultured jejunal explants

	Thr-containing I-FABP	Thr-containing I-FABP
Sucrase (μmole/min/g protein)	51.1±2.5	48.3±4.9
Glucoamylase (μmoles of glucose liberated/min/g protein)	8.2±1.8	10.0±2.4
Lactase (μmoles/min/g protein)	3.9±0.4	3.7±0.6
Alkaline phosphatase (μmoles/min/g protein)	34.3±2.2	35.1±2.1
Glucose uptake (% of total radioactivity)	21.8±3.5	19.4±2.2
CO_2 production (% of total radioactivity)	1.6±0.4	1.4±0.3

Figure 1

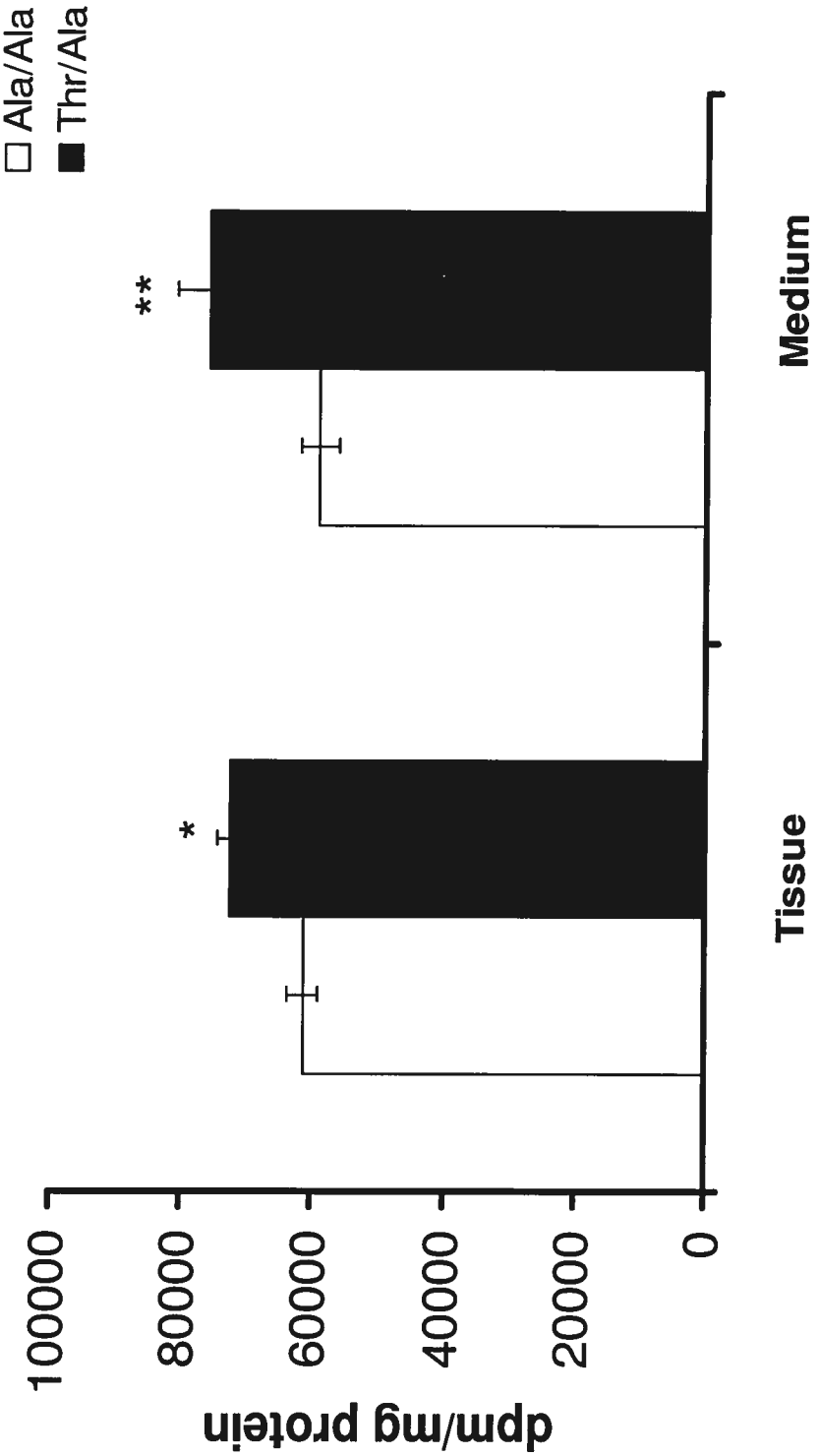

□ Ala/Ala
■ Thr/Ala
dpm/mg protein
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
**
Tissue
Medium

Figure 2

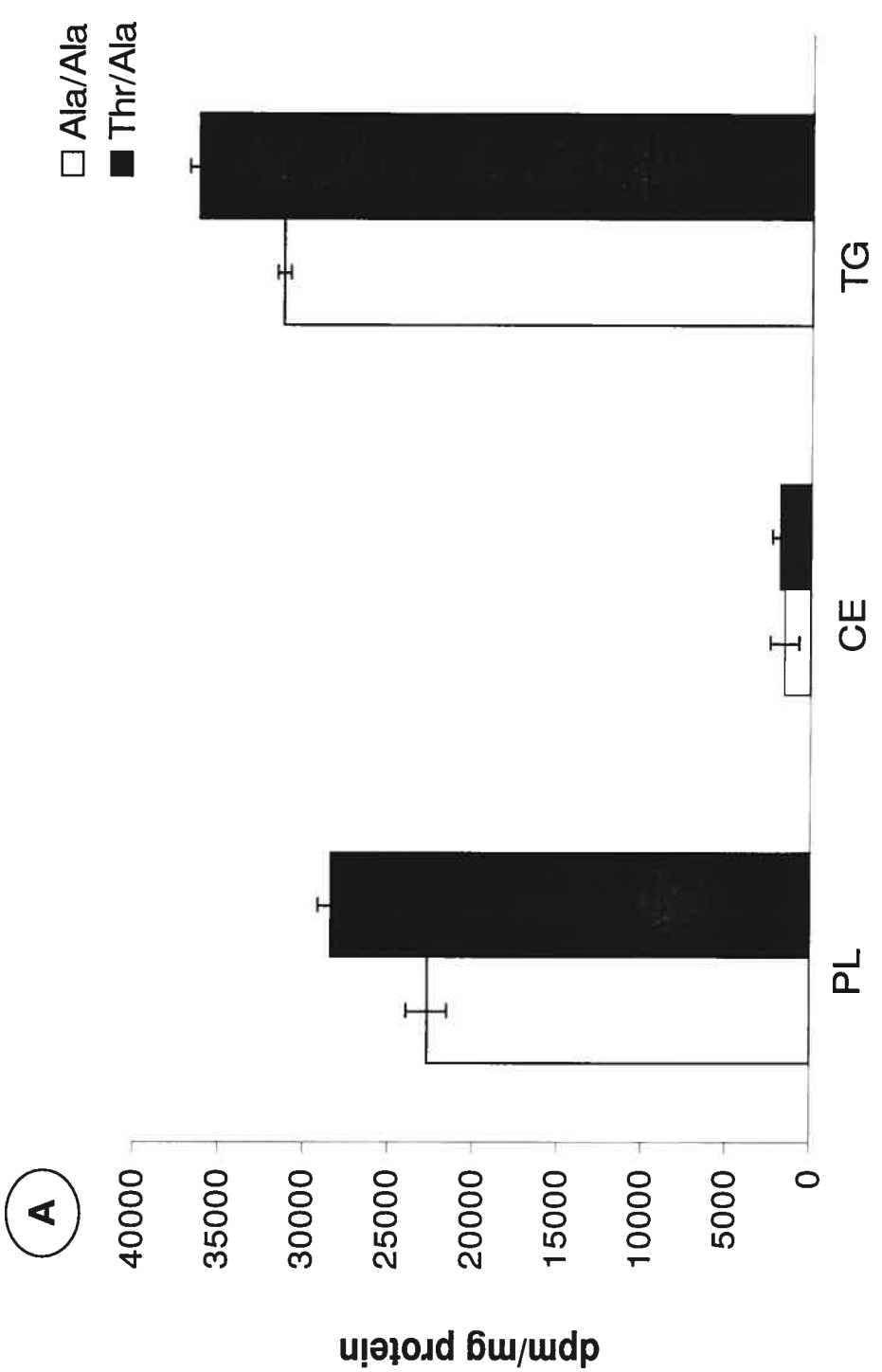

A
□ Ala/Ala
■ Thr/Ala
dpm/mg protein
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PL
CE
TG

Figure 2

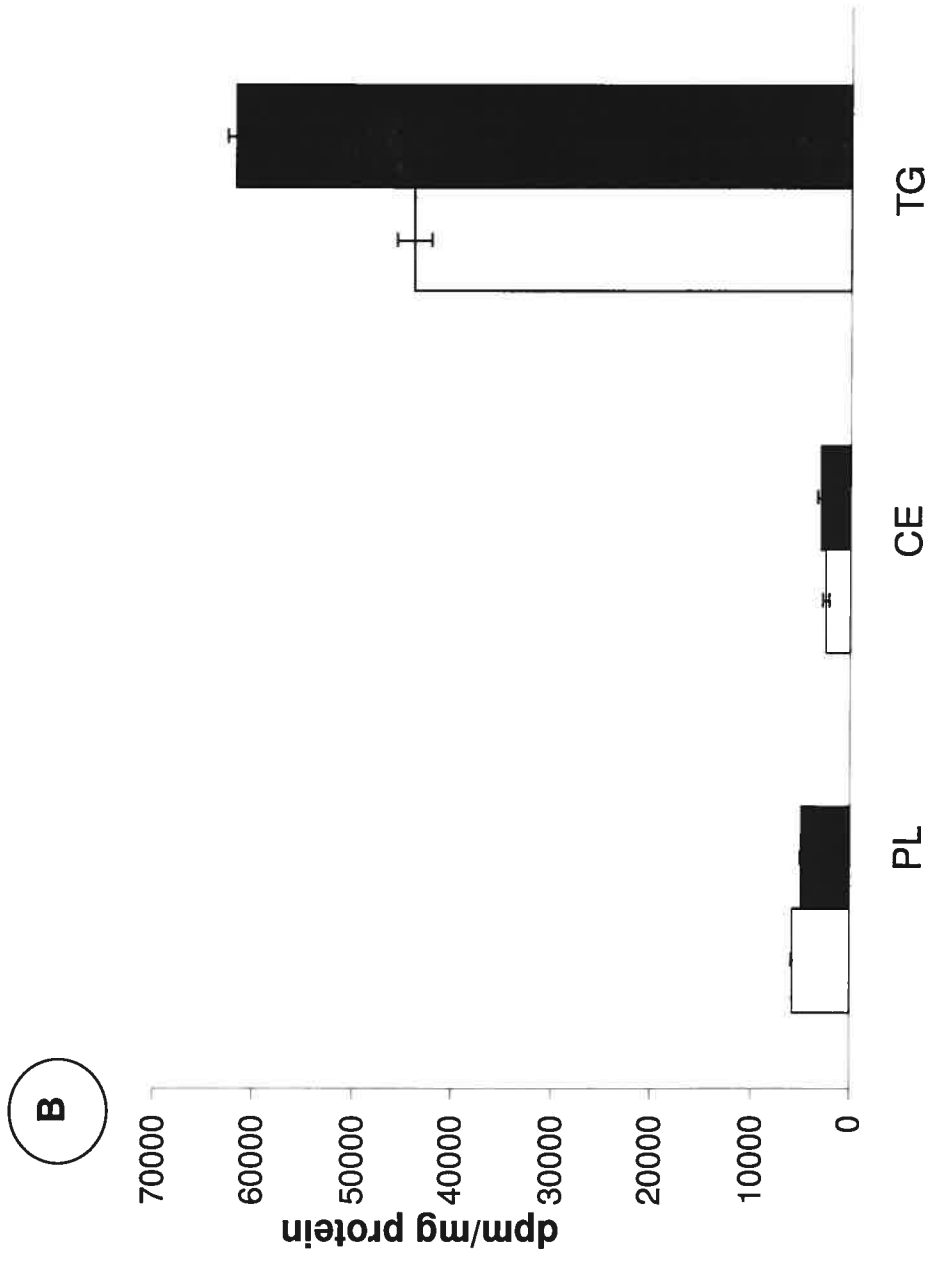

B
dpm/mg protein
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
PL
CE
TG

Figure 3

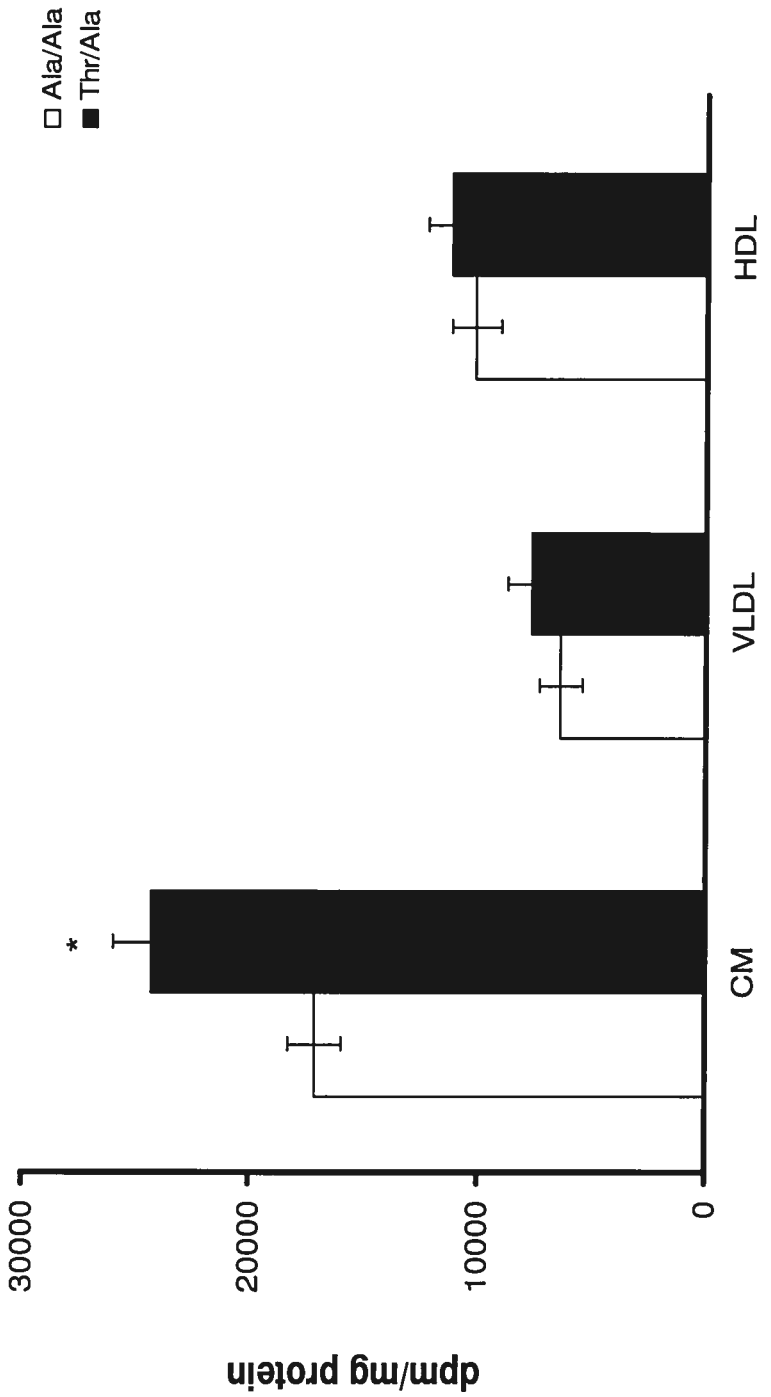


Figure 4

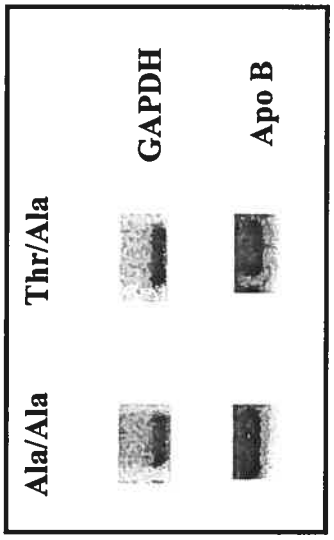
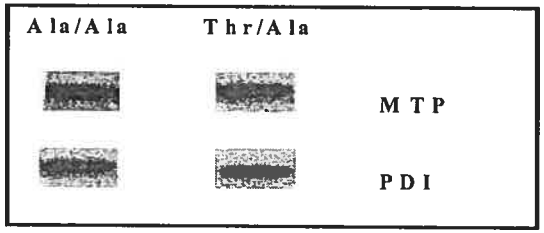
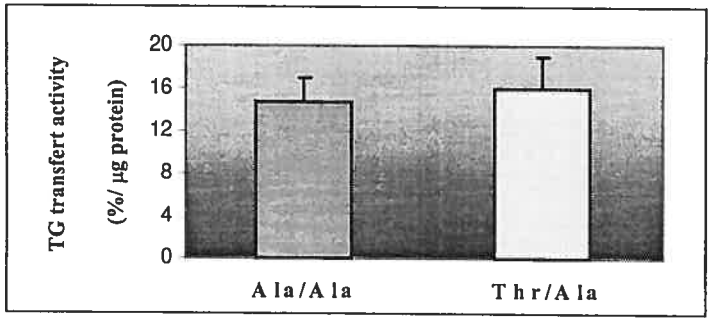


Figure 5

Figure 6


Ala/Ala
Thr/Ala
MTP
PDI


TG transfert activity
(%/ µg protein)
20
16
12
8
4
0
Ala/Ala
Thr/Ala

Deuxième article:

IMMUNOLOCALIZATION, ONTOGENY AND REGULATION OF MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN HUMAN FETAL INTESTINE

En ce qui concerne cette publication, j'ai participé au travail de laboratoire en mettant au point la méthode d'évaluation de l'activité du "microsomal triglyceride transfer protein" et en effectuant les expériences relatives à cette protéine. Par ailleurs, j'ai également participé à la rédaction de cet article, sous la supervision du Dr Emile Levy.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(4), G563-71

IMMUNOLOCALIZATION, ONTOGENY AND REGULATION OF MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN HUMAN FETAL INTESTINE

Levy E[1,2*], Stan S[2], Garofalo C[2], Delvin EE[3], Seidman EG[4], Ménard D[5].

Departments of Pediatrics[4], Biochemistry[3] and Nutrition[2], Université de Montréal, and Department of Anatomy and Cellular Biology[5], Université de Sherbrooke, Québec, Canada

*MRC Research Group in the Functional Development and Physiology of the Digestive Tract

Running title: Intestinal MTP during development.

Corresponding author[1]: Dr. Emile Levy
Gastroenterology Unit
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [redacted]

ABSTRACT

To examine the multiple stages of lipoprotein packaging during development, we studied the localization, ontogeny and regulation of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), a crucial protein for lipid transport. With the use of immunofluorescence, MTP was identified in villus and crypt epithelial cells in different regions of the human fetal intestine, including colon. Staining was detected as early as the 13th week of gestation in all gut segments and was almost entirely confined to the columnar epithelial cells of the jejunum and colon. Unlike immunofluorescence, which provides qualitative but not quantitative information on MTP signal, enzymatic assays revealed a decreasing gradient from proximal small intestine to distal, as confirmed by immunoblot. Activity of MTP in small intestinal explants cultured for different incubation periods (0,4,8, and 24 h) peaked at 4 h, but remained insensitive to different concentrations of oleic acid. Also, a trend toward increasing MTP activity was observed at 20-22 weeks of gestation. Finally, in strong contrast to the jejunal efficiency, colonic explants displayed an impaired lipid production, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein assembly, in association with poor expression of MTP. These findings provide the first evidence that the human fetal gut is able to express MTP and emphasize the distinct regional distribution, regulation by oleic acid and ontogeny of MTP.

Keywords: Fat absorption, developmental biology, lipoprotein metabolism, intestinal transport.

INTRODUCTION

Chylomicron is the main vehicle for the transport of dietary lipids and fat-soluble vitamins (4,8,45). It is exclusively synthesized in the intestine by a highly complex process, that requires the translocation of apolipoprotein (apo) B into the lumen of the endoplasmic reticulum (10,15,25). Compelling evidence has now demonstrated the pivotal role of microsomal transfer protein (MTP) in the biogenesis of apo B-containing lipoproteins (42,49). MTP is a soluble microsomal heterodimer consisting of the multifunctional 58-kDa protein disulfide isomerase (PDI) and a unique large 97-kDa protein that confers lipid transfer activity (48). Identification of MTP as the defective factor in abetalipoproteinemia indicates its essential function in intracellular apo B lipoprotein assembly (43,48,49). Despite knowledge of the morphological, ultrastructural and functional changes occuring during the development of the human gut, information on the biosynthetic events essential for the formation and secretion of triglyceride-rich lipoprotein particles remains fragmentary. Our early studies (23, 24) have successfully used the organ culture technique not only to clarify the mechanism of intracellular lipid transport impairment in human disorders, but also to explore the ontogeny and site of lipoprotein synthesis in the small intestine (28,44). The maintenance of human fetal intestinal tissues in serum-free organ culture has allowed us to demonstrate that, between 14 and 20 weeks of gestation, fetuses have functional mechanisms to elaborate all the lipid classes and to secrete them in the form of lipoprotein particles (28,44). Our findings have stressed the gradual

increase in triglycerides, and chylomicrons in particular, as a function of gestational age, suggesting an ontogeny of the intracellular events leading to lipoprotein formation and exocytosis (44). We also provided evidence for de novo apolipoprotein synthesis, a process that has been proven to be hormonally controlled (26-28, 32, 33). The combination of immunocytofluorescence with radioactivity pulse labeling revealed the regulation of apo A-I and apo B by epidermal growth factor, hydrocortisone and insulin (26-28, 32, 33). It is therefore clear that the mucosal phase of lipid absorption is intact in the developing intestine. However, it is evident that other probes need to be used to examine the assembly and secretion of apo B-containing lipoproteins during gestational periods. Although the role of MTP has never been studied in the prenatal gut mucosa, we surmised that the developing small intestinal epithelium expresses MTP because it secretes apo B in particles, largely of chylomicron, very low density lipoprotein and low density lipoprotein size (28,44). The essence of this hypothesis is that MTP is essential for the first step of apo B core lipidation, transferring sufficient amounts of triglycerides and cholesteryl esters into the hydrophobic domains of apo B to release apo B from endoplasmic reticulum membranes (the requisite first step in the assembly of triglyceride-rich lipoproteins) (20). Furthermore, the localization, ontogeny and regulation of MTP were not investigated during the gestational period. In addition, the distribution profile of PDI has not been established in the small and large intestine during development. Finally, in our ongoing effort to further our understanding of the limited ability of the fetal colon to assemble and secrete apo B-containing

lipoproteins (22, 29), we examined MTP activity to determine its implication in the defective exocytosis. In this study, we focused on all these issues to gain insight into the multiple stages of lipoprotein packaging during development.

MATERIALS AND METHODS

Human Gut Specimens

Small intestine and large bowel tissues were obtained from fetuses ranging from 13 to 20 wk, following legal or therapeutic abortion with informed consent of the patients. No tissues were collected from cases associated with known fetal abnormalities or fetal death. Studies were approved by the Institutional Review Committee for the Use of Human Material of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. The entire gut was immersed in Leibovitz L-15 medium containing gentamycin (Garamycin, 40 µg/ml), and nystatin (Mycostatin, 40 µg/ml) and brought to culture room within 30 min. The proximal half of the small intestine excluding the first 3 cm was defined as the jejunum, whereas the second part was defined as the ileum. The colon was divided in two equivalent portions, the proximal and distal parts.

Organ Culture

This technique was carried out as described previously (26-29, 32, 33, 44). The intestine and colon were cleansed of mesentery, split longitudinally, washed in culture medium, and cut into explants (3x7 mm). Five to seven explants were randomly transferred onto lens paper with the mucosal side

facing up in each organ culture dish (Falcon Plastics, Los Angeles, CA). An amount of medium (0.8 ml) sufficient to dampen the lens paper was added. Explants were cultured in serum-free Leibovitz L-15 medium according to the technique described previously (26-29, 32, 33, 35, 36, 44).

Indirect Immunofluroescence

The preparation and embedding of specimens for cryosectioning were performed as previously described (2) using optimum cutting temperature embedding compounds (Tissue Tek; Miles Laboratories, Alkhart, IN). Cryosections (3-4 µm thick), cut on a Jung Frigocut 2800 N cryostat (Leica Canada, Saint-Laurent, PQ), were fixed on glass slides with acetone-chloroform (1:1) for 5 min at 4°C and washed twice with PBS. Following a 30-min incubation with 10% Blotto-PBS to quench the remaining aldehyde residues, the glass slides were washed twice in PBS. The staining procedure using antibodies and fluorescein was performed at room temperature in humid chambers. Sections were incubated for 1 h with the polyclonal antibodies (generously provided by Drs. JR Wetterau and H Jamil) diluted in 10% Blotto (in PBS-8% BSA, 1:1) at 1:150 for MTP large subunit and PDI. Sections were then washed in PBS and incubated with fluorescein-conjugated sheep anti-rabbit IgG (Boehringer Mannheim, Laval, PQ, Canada) used at dilutions of 1:30 and 1:50 in 10% Blotto-PBS. After extensive washing with PBS, the sections were then mounted in FluoroGuard antipode (Bio-Rad) and viewed with a Reichert Polyvar 2 microscope (Leica, Montreal, PQ, Canada), equipped for epifluorescence. Finally, the primary antibodies were

omitted or replaced by nonimmune rabbit serum at 1:700 dilution. All of these control experiments confirmed the specificity of the results.

Tissue preparation for the determination of MTP activity

The fetal intestinal specimens were homogenized in 1 ml of 10 mM phosphate buffer pH 6.8 containing saponin (100 µg/ml) and protease inhibitors (leupeptin 10 µg/ml, Trasylol 10 µg/ml and pepstatin A 1 µg/ml). The MTP/PDI heterodimer was separated by ultracentrifugation at 100,000 g and the supernatant was loaded onto a 1 ml DEAE cellulose column, preequilibrated with the same buffer (10 mM phosphate buffer, pH 6.8). Impurities were eluted with 2 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing 30 mM NaCl. MTP/PDI heterodimer was eluted with 3 ml of 10 mM phosphate buffer pH (6.8) containing 220 mM NaCl and concentrated using a Centricon 30 cartridge (5,000 rpm for 30 min).

MTP Activity Assay

The triglyceride transfer assay was adapted from Refs. 20 and 51. MTP transfer activity was determined by evaluating the transfer of radiolabeled triacylglycerol between two populations of unilamellar vesicles, as described (19,20,51). The donor and acceptor vesicles were prepared by adding the appropriate amount of lipids to 500 µl of chloroform, followed by drying under a stream of nitrogen, rehydration and probe-sonication in 1.25 ml buffer (15 mM Tris/HCl, pH 7.4, 35 mM NaCl, 0.05% BSA, 3 mM sodium azide and 1 mM EDTA). Donor vesicles contained (per assay) 4 nmol of egg

yolk phosphatidylcholine, 0.33 nmol of cardiolipin, and 0.024 nmol of [^{3}H]-trioleylglycerol (Amersham). Acceptor vesicles contained 24 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.048 nmol of trioleylglycerol and ~4000 cpm [^{14}C] dipalmitoyl phosphatidylcholine (Amersham). Both categories of vesicles comprised 0.01% butylated hydroxytoluene. Various amounts of semi-purified MTP were incubated with 5-µl donor and acceptor vesicles in a final volume of 100 µl for 1 h at 37°C. The reaction was quenched by adding 400 µl of ice-cold 15:35 buffer (without BSA). The negatively charged donor vesicles were removed from the reaction mixture by adsorption onto DEAE-cellulose (Whatman DE-52). The supernatant (containing the acceptor vesicles) was collected after low-speed centrifugation (13,000 rpm x 10 min) and recentrifuged (13,000 rpm x 5 min) to assure total removal of the DEAE-cellulose before scintillation counting. The ratio of [^{3}H]-glycerol trioleate on [^{14}C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine was determined and the percentage of lipid transfer was calculated from the increase in this ratio.

Measurement of Lipid and Lipoprotein Secretion: Colonic and jejunal explants were cultured (48 h) in serum-free Leibovitz L-15 medium containing a final amount of nonlabeled oleic acid (1 µmol/ml) with 0.3 µCi of [^{14}C] oleic acid attached to albumin (sp. act. 53.9 mCi/mmol; Amersham) as reported earlier (22-24, 26-28, 32, 33, 44). The determination of individual lipid classes and lipoproteins in media by one-dimensional thin-layer chromatography and ultracentrifugation, respectively, was carried out according to the techniques described previously in detail (22-24, 26-28, 32, 33).

Labeling, Immunoprecipitation and Electrophoresis of Apolipoproteins: After a 48-h incubation period with [^{35}S]-methionine (100 μCi/ml) and unlabeled oleic acid (1 μmol/ml), intestinal tissues were treated for apo B immunoprecipitation, as described previously (22-24, 26, 27, 32). Apo B samples were resolved by 5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the radioactivity in apo B was quantitated as described previously (22-24, 26, 27, 32) after the appropriate products had been excised from the gels.

Western Blots

To assess the presence of MTP and evaluate its mass, intestinal tissue was homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (2). Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and □-mercaptoethanol, separated on a 4-20% gradient SDS/PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Non specific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against MTP and PDI. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Blots were developed and the mass of MTP and PDI was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± S.E. Mean differences between groups were calculated by unpaired Student's *t*-tests.

RESULTS

Localization of MTP and PDI by Immunofluorescent Studies

To examine the expression of these individual proteins in the different regions of the gut and determine their distribution along the crypt-villus axis, indirect immunofluorescence was carried out. Figures 1 and 2 illustrate the localization of MTP along the crypt-villus axis in the human fetal jejunum and colon, respectively. Immunofluorescence staining was almost entirely observed in the columnar epithelial cells of both segments. MTP staining was detected as early as the 13th wk of gestation in all gut segments, including the duodenum and ileum (not shown). Cytoplasmic immunofluorescence staining was visualized in all absorptive cells located in the crypt-villus axis with no specific compartmentalization. Figure 3 illustrates the distribution pattern of PDI. Cytoplasmic immunofluorescence staining was observed in columnar epithelial cells in all gut segments as early as the 13th week of gestation. PDI staining was detected in crypt as well as villus epithelial cells. In all intestinal segments, goblet cells appeared to be negative for MTP and PDI signals. Taking into account the qualitative nature of this technique, it was not possible to speculate on quantitative aspects relative to MTP and PDI signals.

MTP Activity Along the Intestine

Triacylglycerol transfer activity was measured in different segments of the intestine in the linear range of the assay. MTP activity was estimated by monitoring the transfer of triacylglycerol from donor to acceptor vesicles in the presence or absence of MTP extracts prepared from jejunal, ileal and colonic explants. MTP activity was detected in all the intestinal regions, including the colonic segments (Fig. 4A). However, a descending gradient was apparent from the proximal small intestine to the distal colon, as shown in Fig. 4A. The calculated data disclosed that the MTP activity of the ileum, proximal colon and distal colon represented 61.1%, 8.4% and 7.5% of jejunal samples.

Detection of MTP and PDI Proteins by Immunoblotting

Samples of the different intestinal regions containing equal amounts of protein were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel. An immunoblot of these samples showed immunoreactive bands corresponding to the large subunit of MTP and to the small subunit of PDI (Fig. 4B). Consistent with activity measurements, Western blot analyses showed that the ileum, proximal colon and distal colon contained 75%, 25% and 15%, respectively, of the amount of the large subunit of MTP measured in the jejunum. In contrast, densitometric estimation of the amount of PDI visualized on the immunoblot revealed that the distal colon contained more protein than the small intestine segments.

MTP Activity and Mass in Developing Intestine

Our previous studies documented a gradual increase in the synthesis of triglycerides and chylomicrons as a function of gestational age (44). In the present investigation, we explored the maturation aspect of MTP activity in the explants of the human small and large intestine between 15 and 22 weeks of gestation. Only a trend toward increase was noted in the jejunal explants at the period of 20-22 weeks of gestation (Fig. 5). On the other hand, no marked modification was apparent in MTP activity and mass in colonic explants with fetal age.

Studies on MTP in Intestinal Organ Culture

In an attempt to evaluate the effect of fatty acids on MTP activity and mass, jejunal and colonic explants were cultured in serum-free Leibovitz L-15 medium supplemented with oleic acid. No marked changes were noted in MTP levels following the addition of oleic acid (Fig. 6). Furthermore, in order to determine whether alterations occur in MTP activity and mass as a function of incubation periods, jejunal explants were cultured at 0,4,8 and 24 h. As illustrated in Figure 7, MTP peaked at 4 h and decreased progressively at 8 and 24 h.

Studies on Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins in Intestinal Organ Culture

To characterize the lipoprotein particles secreted by jejunal and colonic explants, the cultures were supplemented with 1 µmol/ml oleic acid. Since the output rate of triacylglycerol by the jejunal explants is relatively low and typical of cell culture, the explants were cultured for a 48-h incubation period. Then, the conditioned media were collected, lipids were determined, apo B analyzed and lipoproteins were isolated by sequential ultracentrifugation. Colonic explants secreted ~ 20% of total lipids exported by the jejunum (Fig. 8). Under our experimental conditions, the major lipid classes esterified by the colon and transported into the medium never exceeded 30% of the jejunum's capacity. Similarly, the production of apo B by colonic explants was 30-40% of the level of jejunal explants. In association with the lower ability to transport lipids, apo B and lipoproteins, colonic explants displayed limited triacylglycerol transfer capabilities. Both the activity and protein mass of MTP were relatively poorly expressed in colonic explants.

DISCUSSION

We previously reported that triglyceride-rich particles are generated by the absorptive cells of the fetal intestine (26-28, 32, 33, 44). Furthermore, our recent studies have established that normal human crypt cells are able to express apolipoproteins and export lipoproteins, which suggests that the lipoprotein assembly process is not restricted to mature villus enterocytes

(21). An important prediction arising from our reports was that MTP should be expressed in the developing gut. The present investigation provides support for this hypothesis. In the current work, a series of immunofluorescent findings have documented the presence of MTP in both villus and crypt epithelial cells of the small intestine and colon. PDI, necessary to maintain the catalytically active structure of MTP, was also identified in the same intestinal regions. Biochemical manipulations revealed substantial MTP activity, which appeared as a decreasing gradient from the proximal small intestine to the colon. Jejunal explants in culture did not show changes in MTP mass and activity following the addition of oleic acid, whereas a trend toward increase was noted over the fetal periods studied and in response to a 4-h incubation period. Importantly, colonic explants exhibited low expression of MTP. These observations combined with our previous reports demonstrate the small intestine's ability to synthesize and secrete apo B-containing lipoproteins during development. Also, the colon's limited capacity for lipid transport, in sharp contrast to the jejunum's efficiency, was associated with the reduced MTP protein amount and activity.

Assembly of triglyceride-rich lipoproteins involves a complex process in which apo B is packaged with lipids from the hydrophobic core and polar surface (9,40,41). Lipoprotein formation is initiated as apo B is translocated into the lumen of the endoplasmic reticulum (9,40,41). MTP appears essential to this process in order to form stable nascent apo B-containing lipoprotein particles in the endoplasmic reticulum, which otherwise would be degraded.

The current experiments demonstrate that fetuses have the machinery in place that is necessary to assemble lipoproteins. In fact, our results indicate that MTP is already present at the gestational period to direct apo B into the lipoprotein assembly and secretion pathway. Notably, its functioning may be useful for *1*) the absorption of lipids and fat-soluble compounds contained in the amniotic fluid and meconium (3); *2*) fatty acids transported from mother to fetus (14); and/or *3*) the preparation of postnatal life characterized by a high fat intake.

Our recent work has demonstrated the potential of the colon to absorb nutrients, including fat, at precocious stages of development (1, 22), which correlates with the formation of villi similar to those in the small intestine and the appearance of brush-border hydrolytic activities. Despite the capability of the fetal large bowel to esterify lipids and synthesize apolipoproteins, such as apo B-48 and apo B-100, a striking failure in lipoprotein assembly and secretion was evidenced compared with the jejunum originating from the same fetuses (22). The defect was not localized at the level of apo B mRNA editing, since this unique posttranscriptional event producing apo B-48 via an alteration of the RNA sequence was found fully normal in the colon (22). The possible compounding factor leading to the impairment of lipoprotein delivery by the colon could be attributed to an abnormally low level of MTP, as demonstrated by the present data. This is strongly supported by the various roles of MTP: *1*) affected individuals with abetalipoproteinemia exhibit an absolute requirement of MTP for apo B-containing lipoprotein production

(2,20,49,51); *2*) the expression of MTP in HeLa cells, a non-lipoprotein-producing cell line was sufficient to reconstitute the efficient assembly of apo B-53 and lipid into a macromolecular lipoprotein particle that was secreted from the cell (13); and *3*) the inhibition of MTP activity in HepG2 cells, a human liver-derived cell line that secretes apo B-containing lipoproteins, impaired lipid transport in a concentration dependent manner (5,16,46). Since MTP and apo B interact during lipoprotein assembly (5,46,52), the reduction in the amount of MTP in colonic explants might have affected lipoprotein production. Additional work is obviously necessary to delineate whether MTP continues to be somewhat active in the mature colon or disappears at birth, thereby explaining the failure of the adult human colon to efficiently transport lipids.

The influence of oleic acid on the activity and mass of MTP was evaluated in cultured jejunal explants. Oleic acid supplements to culture media had no effect on MTP levels. These data are in agreement with those of Mathur *et al* (34). who reported that, in Caco-2 cells, neither MTP activity nor MTP mass changed in response to lipid mediators, known to stimulate apo B secretion. Similarly, the addition of fatty acids to HepG2 cells did not alter MTP mRNA levels (31). The treatment of hamsters with high fat diets also resulted in a moderate increase in intestinal MTP gene expression (30). Since a hormonal regulation of apolipoproteins and lipoproteins was shown in jejunal and colonic explants (1, 26-28, 32, 33, 44), further work is needed to

explore the regulation of MTP by hydrocortisone, epidermal growth factor and insulin.

PDI is a ubiquitous protein which has multiple functions within the lumen of the endoplasmic reticulum (12). It catalyzes the formation of disulfide bonds in newly synthesized proteins (11), thus promoting the proper folding of disulfide-bonded proteins (6). It also functions as the β-subunit of prolyl 4-hydroxylase, which generates 4-hydroxyproline that in turn contributes to the stability of the collagen triple helical structure (17). Other suggested functions of PDI include chaperone and binding activities. Indeed, PDI serves as a chaperone-like protein that nonspecifically binds peptides in the endoplasmic reticulum (19,37-39) and can act as a major cellular thyroid hormone binding protein (7), a developmentally regulated retinal protein termed r-cognin (18) and dehydroascorbate reductase (47). As illustrated by the present findings, our immunofluorescence studies could not discriminate between the distribution patterns of MTP and PDI. As a subunit in the lipid transfer protein complex, it probably colocalises with the 88-kDa MTP in the enterocyte during development in order to confer lipid transfer activity. Probably, PDI is necessary for normal cell functioning whereas MTP may only be required for those cells that transport triacylglycerol.

In conclusion, our immunofluorescent observations illustrate the distribution of MTP and PDI in the small and large intestine. Our systematic investigation has demonstrated for the first time that MTP and PDI are distributed along the entire length of the gut. The restricted pattern of MTP

activity and protein in the colon is consistent with its reduced lipoprotein secretion capacity. Thus, the present studies provide *in vitro* support for the hypothesis of apo B core lipidation, demonstrating the ability of MTP to modulate the assembly and secretion of TG-rich lipoproteins. When lipid addition at the site of apo B assembly is reduced through low MTP activity as observed in colonic specimens, a lower yield of apo B-containing lipoproteins is noticeable.

Acknowledgment

We thank Drs. JR Wetterau and H Jamil for the polyclonal antibodies. We also acknowledge the expert secretarial assistance of D. St-Cyr Huot. We thank Lina Corriveau and Louise Thibault for technical assistance and Drs. C. Poulin and F. Jacot of the Département de la Santé Communautaire for their excellent cooperation in providing tissue specimens for the study. This was supported by a research grant from the Medical Research Council of Canada (MRC) (MT-10583 and MGC-15186) and the Canadian Heart Association. E. Levy is a member of the MRC Research Group in the Functional Development and Physiology of the Digestive Tract.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression and distribution of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) in crypt-villus axis of the fetal jejunum. Representative indirect immunofluorescence micrographs of cryosections of human fetal jejunum are shown. Specimens were stained with anti-MTP large subunit at 13 weeks of gestation (a) and 20 weeks of gestation (b), magnification, x 115. Nonimmune mouse serum was used as control (c), magnification x 70.

Figure 2: Expression and distribution of MTP in crypt-villus axis of the fetal colon. Representative indirect immunofluorescence micrographs of cryosections of human fetal colon are shown. Specimens were stained with anti-MTP large subunit at 13 wk of gestation in proximal colon (a; x 150), 20 wk of gestation in proximal colon (b;,x 150) and 20 wk of gestation in distal colon (d; x 100). Nonimmune mouse serum was used as control (C; x 100).

Figure 3: Expression and distribution of protein disulfide isomerase (PDI) in crypt-villus axis of the fetal jejunum and colon. Representative indirect immunofluorescence micrographs of cryosections of human fetal jejunum and colon are shown. Specimens were stained with anti-PDI at 20 wk of gestation in jejunum (a; x 140) and 20 wk of gestation in proximal colon (c; x 140). Nonimmune mouse serum was used as control in jejunum (b; x 70) and colon (d; x 70) respectively.

Figure 4: Pattern of MTP activity (A) and mass (B) in different regions of human fetal intestine. Intestinal explants from fetuses (17-20 wk of gestation) were cultured in the presence of oleic acid as described in Materials and Methods. At the end of the incubation period, explants were washed and prepared for the determination of MTP activity and analysis by Western blot. TG, triglyceride. Values are means ± SE of 6-8 experiments/group. $^{a}P<0.05$, vs. jejunum; $^{b}P<0.001$ vs. jejunum; $^{c}P<0.001$ vs. ileum.

Figure 5: Quantifcation of MTP activity (A) and protein (B) in human fetal small intestine and colon from 15-20 wk of gestation. Values are means ± SE of 3-4 experiments/group. $^{a}P<0.05$.

Figure 6: The effects of oleic acid on MTP activity and mass. Jejunal and colonic explants were cultured for 24 h in the presence (+ O) or absence (-O) of oleic acid. Tissues were then prepared for the determination of MTP activity (A) and MTP analysis by Western blot (B). Values are means ± SEM of 7-8 experiments/group.

Figure 7: The effects of time length on MTP activity and mass. Small intestinal explants were cultured at different periods. Then, the explants were treated for the measurement of MTP activity (A) and protein mass (B).

Figure 8: Colonic secretion of lipids, apolipoprotein (apo) B and lipoproteins as a percentage of jejunal secretion capacity. Colonic and jejunal fetal explants were incubated for 48 h with [^{14}C] oleic acid to follow lipid/lipoprotein secretion or with [^{35}S]-methionine to determine apolipoprotein production. Jejunum values (dpm/mg protein) were: total lipids: 272, 222±5, 444; triglycerides (TG): 218, 650±6, 562; phospholipids (PL): 74, 072±2, 481; cholesteryl esters (CE): 16, 101±933; apolipoprotein B (apo B):3, 696.90±348; chylomicron (CM): 40, 000±1, 224; very low density lipoprotein: 14, 705±1, 737; high density lipoprotein:70, 588±3, 629. Results represent mean percent of jejunal values (n=3). * $P < 0.01$ vs. jejunal values.

REFERENCES

1. Basque JR, E Levy, JF Beaulieu, and D Ménard. Apolipoproteins in human fetal colon: immunolocalization, biogenesis and hormonal regulation. *J Cell Biochem* 70:354-365, 1998.

2. Beaulieu JF, MM Weiser, L Herrera, and A Quaroni. Detection and characterization of sucrase-isomaltase in adult human colon and in colonic polyps. *Gastroenterology* 98:1467-1477, 1990.

3. Bernhard K, and F Lindlar. Uber die Lipide des Mekoniums. *Helv Chir Acta* 39:1443-1445, 1956.

4. Black DD. Intestinal lipoprotein metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 20:125-147, 1995

5. Bradbury P, CJ Mann, S Köchl, TA Anderson, SA Chester, JM Hancock, PJ Ritchie, J Amey, GB Harrison, DG Levitt, LJ Banaszak, J Scott, and CC Shoulders. A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 274:3159-3164, 1999.

6. Bulleid NJ, and RB Freedman. Defective co-translational formation of disulfide bonds in protein disulfide-isomerase-deficient microsomes. Nature 335:649-651, 1988.

7. Cheng SY, QH Gong, C Parkinson, EA Robinson, E Appella, GT Merlino, and I Pastan. The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262:11221-11227, 1987.

8. Davidson NO. Cellular and molecular mechanisms of small intestinal lipid transport. *Physiology of Gastrointestinal Tract.* Johnson LR, editor. Third edition., New York: Raven Press, 1993, p. 1909-1934.

9. Davis RA, RN Thrift, CC Wu, and KE Howell. Apolipoprotein B is both integrated into and translocated across the endoplasmic reticulum membrane. Evidence for two functionally distinct pools. *J Biol Chem* 265:10005-10011, 1990.

10. Field FJ, and SN Mathur. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog Lipid Res* 34:185-198, 1995.

11. Freedman RB. A protein with many functions? Nature 337:407-408, 1989.

12. Freedman RB, TR Hirst TR, and MF Tuite. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 19:331-336, 1994.

13. Gordon DA, H Jamil, D Sharp, D Mullaney, Z Yao, RE Gregg, and J Wetterau. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7628-7632, 1994.

14. Hahn P. Development of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2:91-111, 1982.

15. Hamilton RL, JS Wong, CM Cham, LB Neilsen, and SG Young. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J Lipid Res* 39:1543-1557, 1998.

16. Jamil H, DA Gordon, DC Eustice, CM Brooks, KJ Dicison Jr, Y Chen, B Ricci, CH Chu, TW Harrity, CP Ciosek Jr, SA Biller, RE Gregg, and JR Wetterau. An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apo B secretion from HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11991-11995, 1996.

17. Koivu J, R Myllyla, T Helaakoski, T Pihlajaniemi, K Tasanen, and KI Kivirikko. A single polypeptide acts both as the beta subunit of prolyl 4-hydroxylase and as a protein disulfide-isomerase. *J Biol Chem* 262:6447-6449, 1987.

18. Krishna Rao AS, and RE Hausman. cDNA for R-cognin: homology with a multifunctional protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2950-2954, 1993.

19. LaMantia ML, and WJ Lennarz. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell* 74:899-908, 1993.

20. Leiper JM, JD Bayliss, RJ Pease, DJ Brett, J Scott, and CC Shoulders. Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J Biol Chem* 269:21951-21954, 1994.

21. Levy E, JF Beaulieu, E Delvin, E Seidman, W Yotov, JR Basque, D Ménard. Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 41:12-22, 2000.

22. Levy E, N Loirdighi, L Thibault, TD Nguyen, D Labuda, E Delvin, and D Ménard. Lipid processing and lipoprotein synthesis by human fetal colon. *Am J Physiol* 270 (Gastrointest Liver Physiol 33):G813-G820, 1996.

23. Levy E, Y Marcel, G Lepage, R Deckelbaum, and CC Roy. Intestinal apo B synthesis and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res* 28:1263-1274, 1987.

24. Levy E, Y Marcel, RW Milne, VL Grey, and CC Roy. Absence of intestinal synthesis of apoprotein B-48 in two cases of abetalipoproteinemia. *Gastroenterology* 93:1119-1126, 1987.

25. Levy E, M Mehran, and E Seidman. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9:626-635, 1995.

26. Levy E, D Sinnett, L Thibault, TD Nguyen, E Delvin, and D Ménard. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Letter* 393:253-258, 1996.

27. Levy E, L Thibault, E Delvin, and D Ménard. Apolipoprotein synthesis in human fetal intestine: regulation by epidermal growth factor. Biochem. *Biophys Res Commun* 204:1340-1345, 1994.

28. Levy E, L Thibault, and D Ménard. Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. *J Lipid Res* 33:1607-1617, 1992.

29. Levy E, W Yotov, EG Seidman, C Garofalo, E Delvin, and D Ménard. Caco-2 cells and human fetal colon: a comparative analysis of their lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 1439:353-362, 1999.

30. Lin MCM, C Arbeeny, K Bergquist, B Kienzle, DA Gordon, and JR Wetterau. Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acid and triglycerides. *J Biol Chem* 269:29138-29145, 1994.

31. Lin MCM, D Gordon, and JR Wetterau. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res* 36:1073-1081, 1995.

32. Loirdighi N, D Ménard, E Delvin, and E Levy. Selective effects of hydrocortisone on intestinal lipoprotein and apolipoprotein synthesis in the human fetus. *J Cell Biochem* 66:65-76, 1997.

33. Loirdighi N, D Ménard, and E Levy. Insulin decreases chylomicron production in human fetal intestine. *Biochim Biophys Acta* 1175:100-106, 1992.

34. Mathur SN, E Born, S Murthy, and RJ Field. Microsomal triglyceride transfer protein in Caco-2 cells: characterization and regulation. *J Lipid Res* 38:61-67, 1997.

35. Ménard D, and P Arsenault. Explant culture of human fetal small intestine. *Gastroenterology* 88:691-700, 1985.

36. Ménard D, P Arsenault, and P Pothier. Biological effects of epidermal growth factor in human fetal jejunum. *Gastroenterology* 53:319-326, 1988.

37. Otsu M, F Omura, T Yoshimori, and M Kikuchi. Protein disulfide isomerase associates with misfolded human lysozyme in vivo. J Biol Chem 269:6874-6877, 1994.

38. Puig A, and HF Gilberg. Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase-catalyzed refolding of reduced denatured lysozyme. J Biol Chem 269:25889-25896, 1994.

39. Puig A, MM Lyles, R Noiva, and HF Gilbert. The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 269:128-135, 1994.

40. Rusinol AE, EYW Chan, and JE Vance. Movement of apolipoprotein B into the lumen of microsomes from hepatocytes is disrupted in membranes enriched in phosphatidylmonomethylethanolamine. *J Biol Chem* 268:25168-25175, 1993.

41. Sakata N, X Wu, JL Dixon, and HN Ginsberg. Proteolysis and lipid-facilitated translocation are distinct but competitive processes that regulate secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells. *J Biol Chem* 268:22967-22970, 1993.

42. Sharp D, L Blinderman, KA Combs, B Kienzle, B Ricci, K Wager-Smith, CMM Gil, CW Turck, ME Bouma, DJ Rader, LP Aggerbeck, RE Gregg, DA Gordon, and JR Wetterau, Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365:65-69, 1993.

43. Shoulders CC, DJ Brett, JD Bayliss, TME Narcisi, A Jarmuz, TT Grantham, RD Leoni, S Bhattacharya, RJ Pease, PM Cullen, S Levi, PGH Byfield, P Purkiss, and J Scott. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Human Mol Genet* 2:2109-2116, 1993.

44. Thibault L, D Ménard, N Loirdighi, and E Levy. Ontogeny of intestinal lipid and lipoprotein synthesis. *Biol Neonate* 62:100-107, 1992.

45. Tso P. Intestinal lipid absorption. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* Johnson LR, editor. New York: Raven Press, 1994, p. 1867-1907.

46. Wang Y, RS McLeod, and Z Yao. Normal activity of microsomal triglyceride transfer protein is required for the oleate-induced secretion of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B from McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 272:12272-12278, 1997.

47. Wells WW, DP Xu, YF Yang, and PA Rocque. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* 265:15361-15364, 1990.

48. Wetterau JR, and DB Zilversmit. A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J Biol Chem* 259:10863-10866, 1984.

49. Wetterau JR, JP Aggerbeck, ME Bouma, C Eisenberg, A Munck, M Hermier, J Schmitz, G Gay, DJ Rader, and RE Gregg. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258:999-1001, 1992.

50. Wetterau JR, MCM Lin, and H Jamil. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1345:136-150, 1997.

51. Wetterau, JR, and DB Zilversmit. Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chem Phys Lipids* 38:205-222, 1985.

52. Wu X, M Zhou, L Huang, J Wetterau, and HN Ginsberg. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of apo B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 271:10277-10281, 1996.

Figure 1

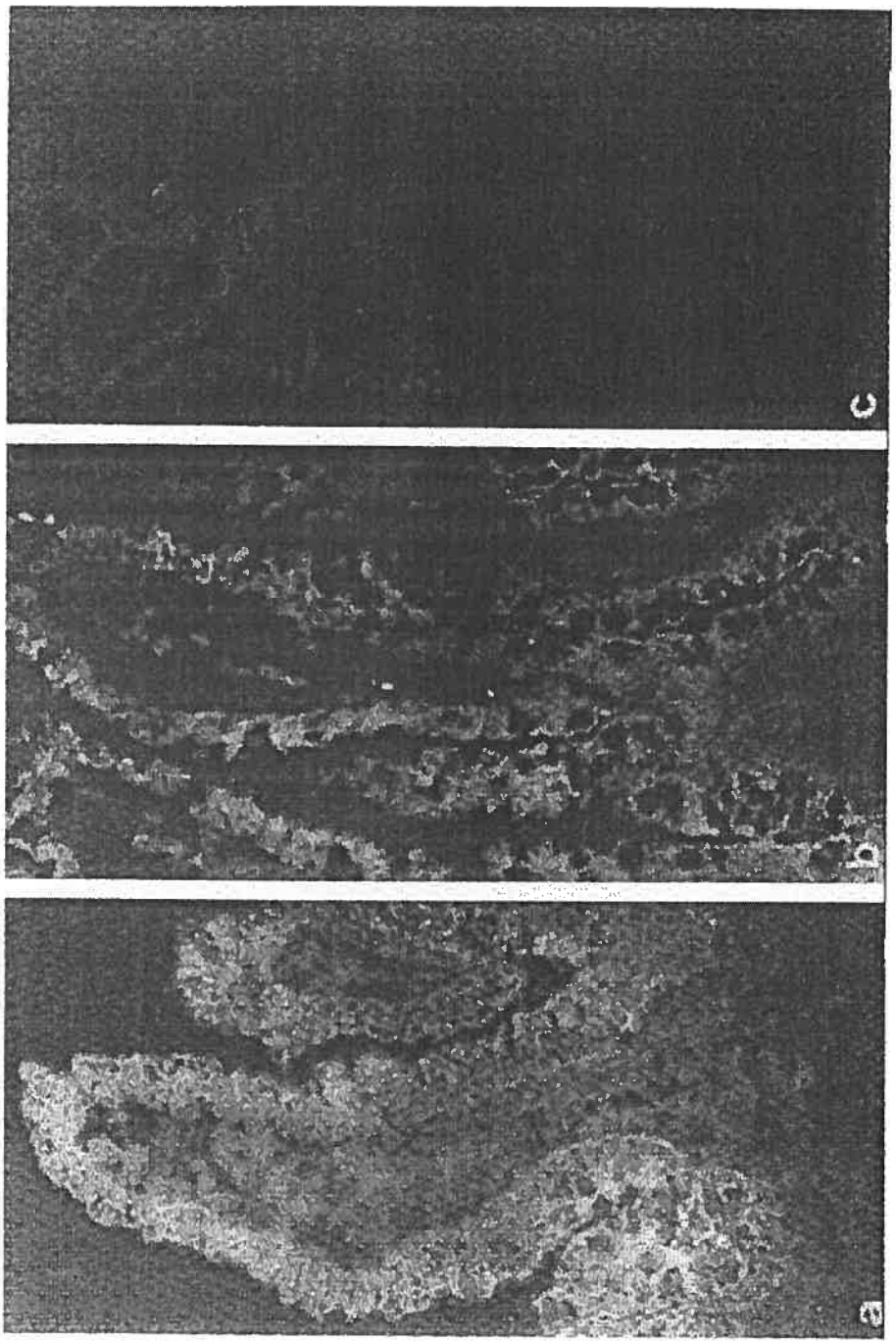


Figure 2

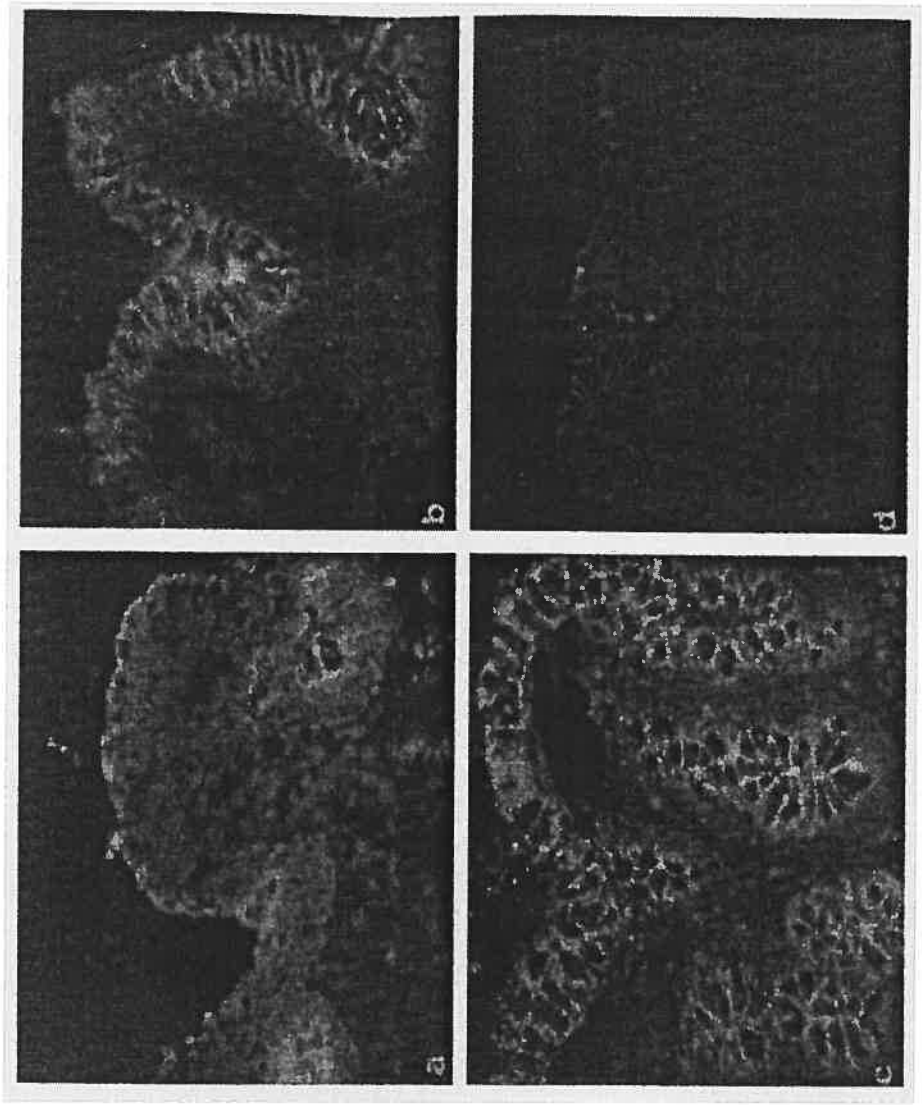


Figure 3

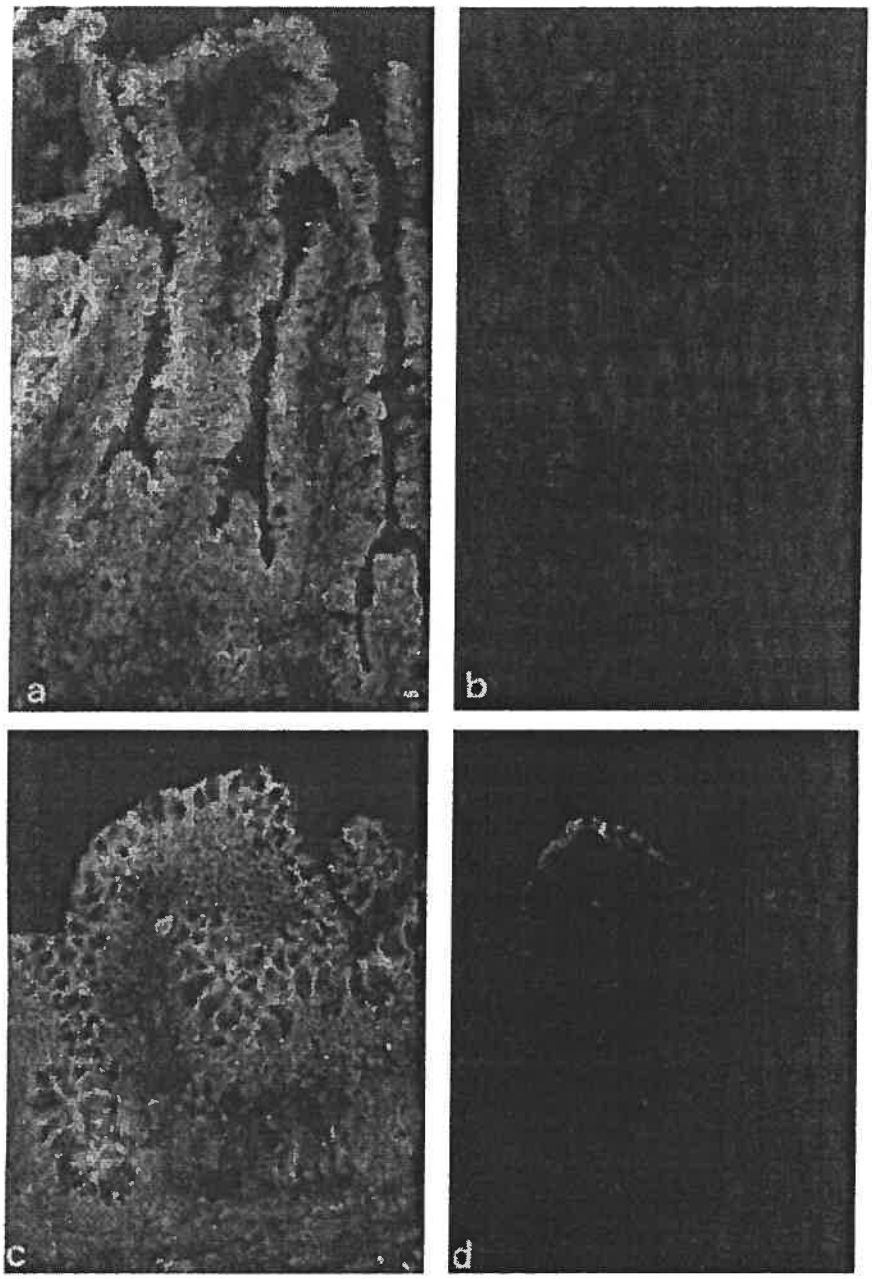


Figure 4

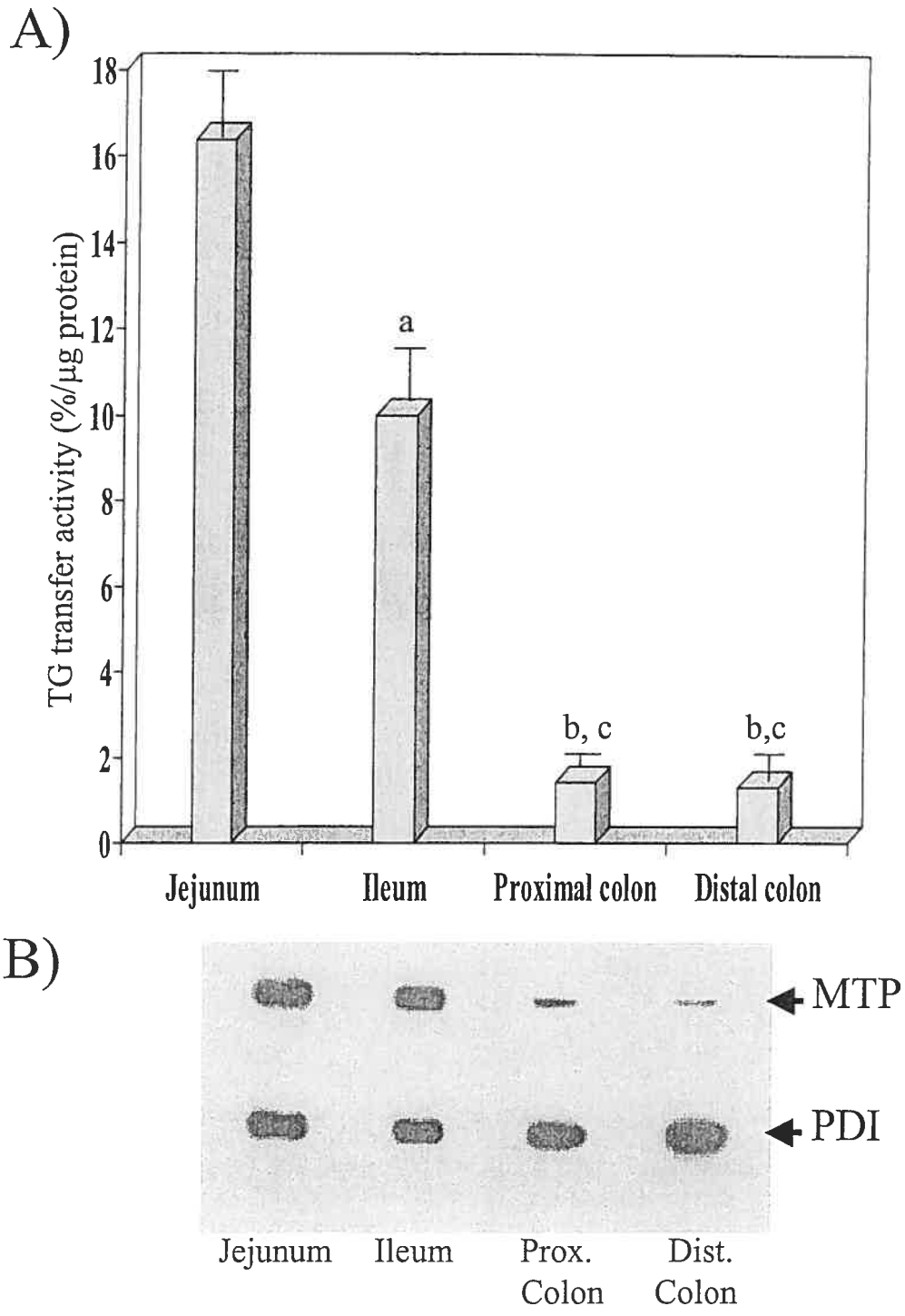

A)
TG transfer activity (%/µg protein)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
a
b, c
b,c
Jejunum
Ileum
Proximal colon
Distal colon
B)
MTP
PDI
Jejunum
Ileum
Prox. Colon
Dist. Colon

Figure 5

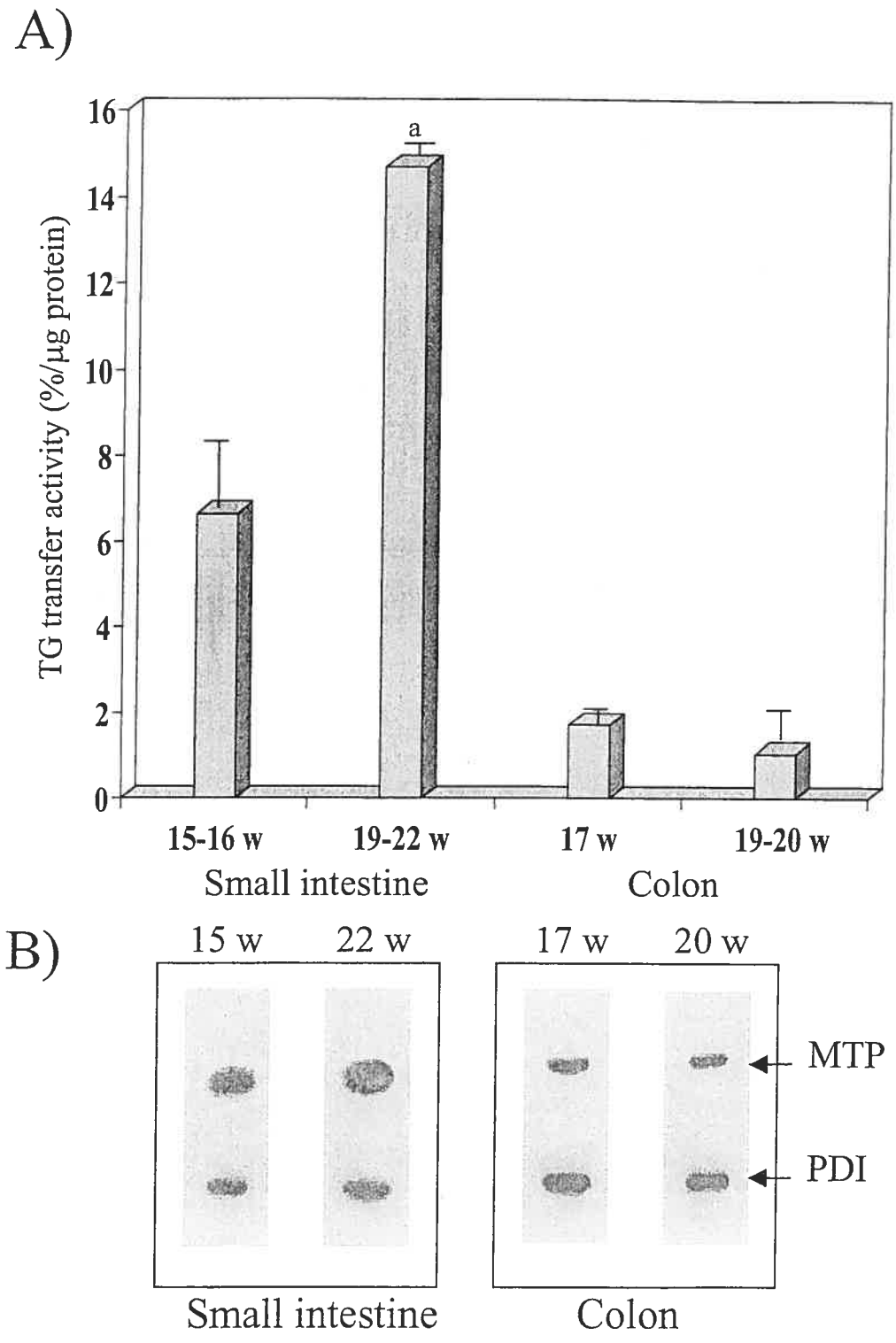

A)
TG transfer activity (%/µg protein)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
a
15-16 w
19-22 w
17 w
19-20 w
Small intestine
Colon
B)
15 w
22 w
17 w
20 w
MTP
PDI
Small intestine
Colon

Figure 6

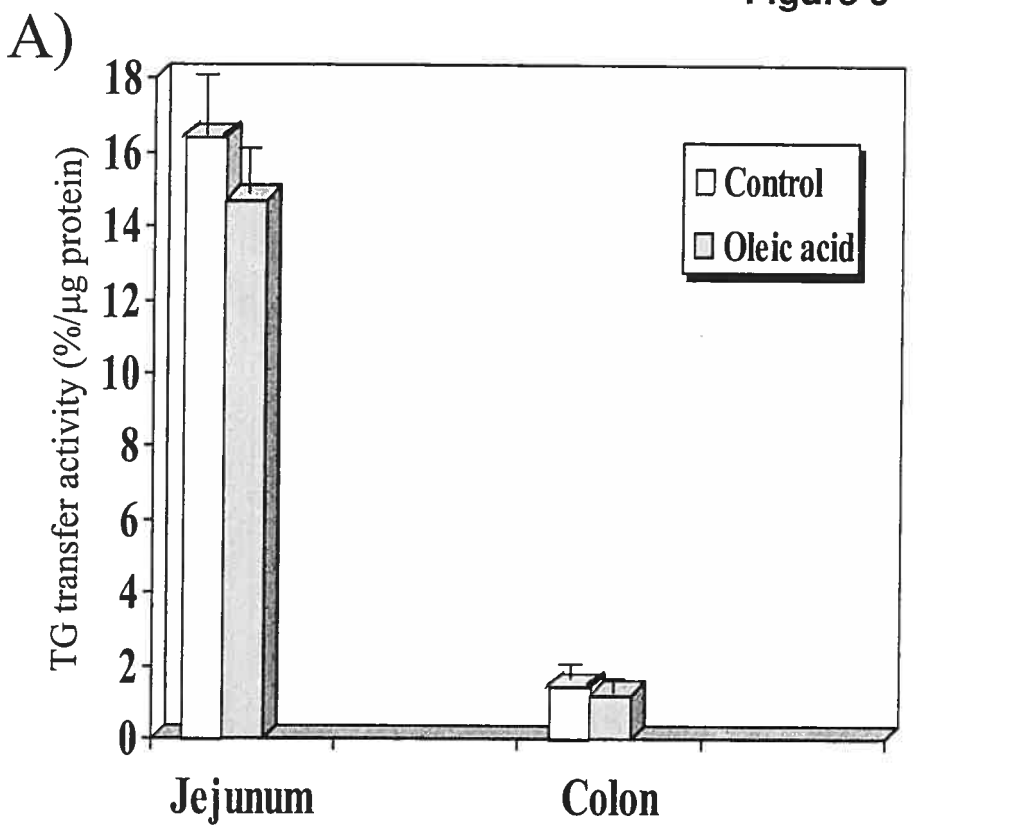

A)
TG transfer activity (%/µg protein)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
Oleic acid
Jejunum
Colon
B)
MTP
PDI
- O
+ O
- O
+ O
Jejunum
Colon

Figure 7

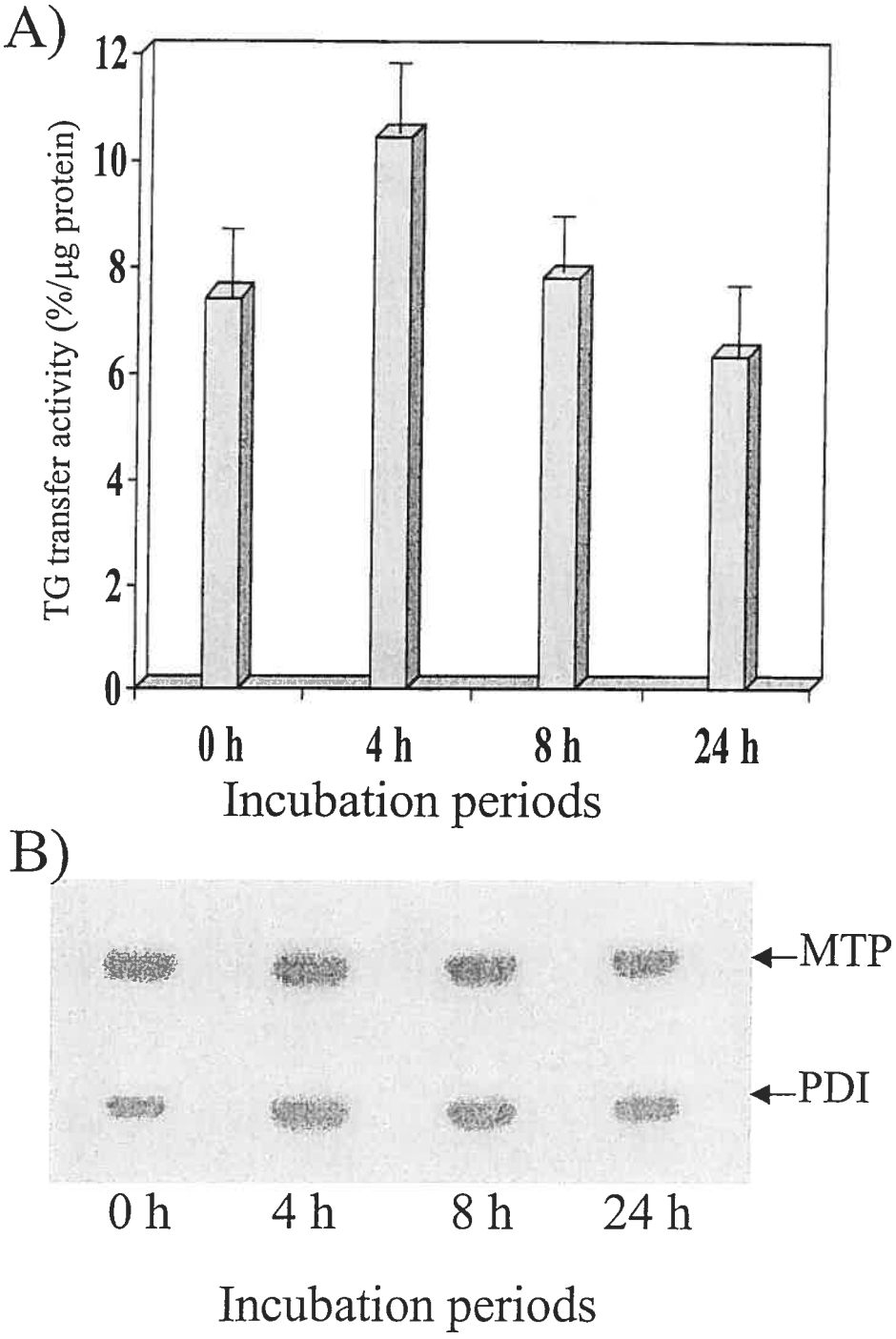
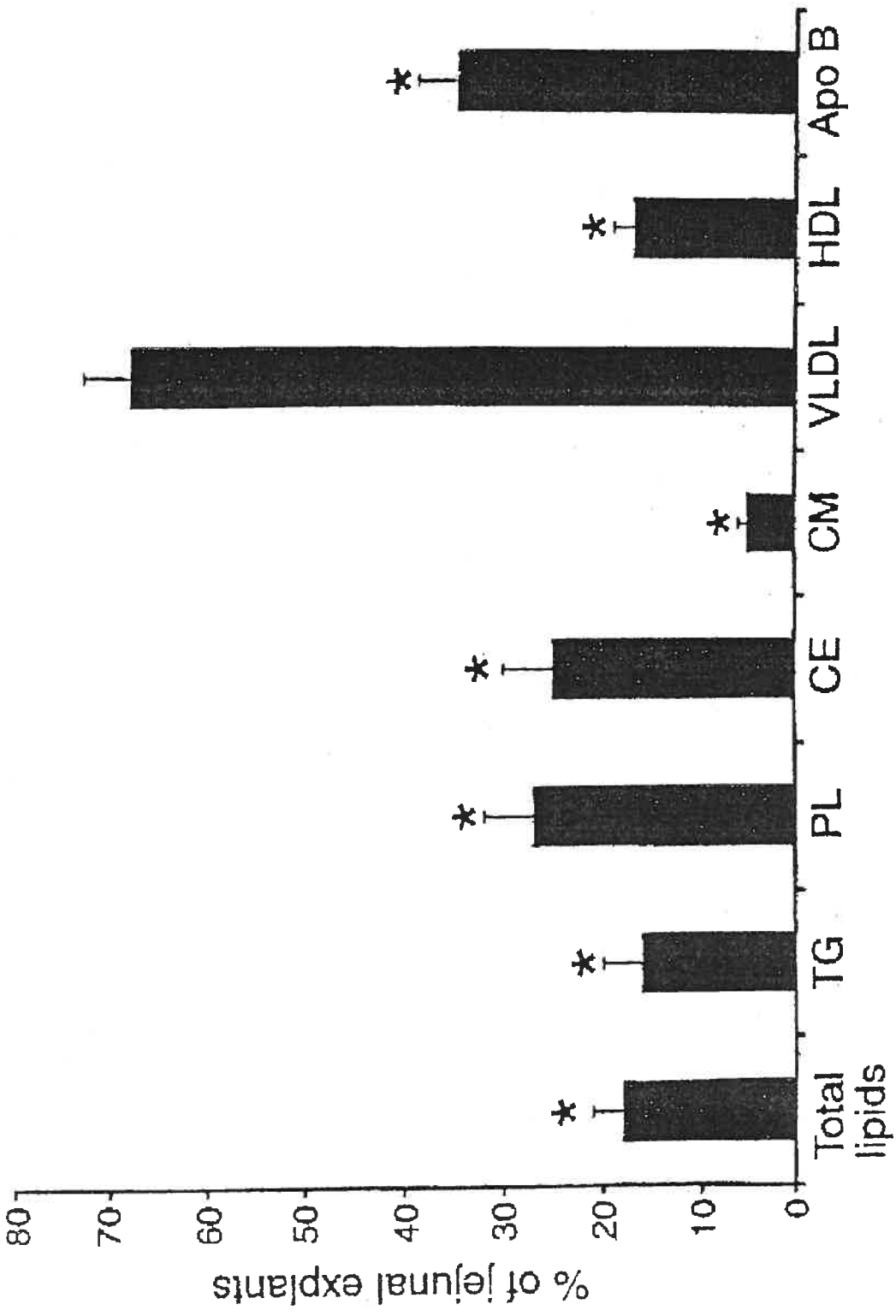

A)
12
10
8
6
4
2
0
TG transfer activity (%/μg protein)
0 h
4 h
8 h
24 h
Incubation periods
B)
←MTP
←PDI
0 h
4 h
8 h
24 h
Incubation periods

Figure 8


% of jejunal explants
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Total lipids
TG
PL
CE
CM
VLDL
HDL
Apo B
*

Troisième article:

LOCALIZATION OF MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN THE GOLGI: POSSIBLE ROLE IN THE ASSEMBLY OF CHYLOMICRONS

Dans cette publication, je suis intervenue dans les travaux de laboratoire, par la mise au point de la méthode permettant d'évaluer l'activité du "microsomal triglyceride transfer protein" et l'éxécution des expériences correspondantes au dosage de l'activité et aux immunoprécipitations, tout en participant à la rédaction de l'article, sous la supervision du Dr Levy.

J Biol Chem. 2002 May 10;277(19):16470-7

LOCALIZATION OF MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN THE GOLGI: POSSIBLE ROLE IN THE ASSEMBLY OF CHYLOMICRONS

Emile Levy, Simona Stan, Edgard Delvin, Daniel Ménard, Carol Shoulders, Carole Garofalo, Isabelle Slight, Ernest Seidman, Gaétan Mayer, Moïse Bendayan.

From the Departments of Nutrition, Biochemistry, Pediatrics, Pathology and Cell Biology Hôpital Sainte-Justine and University of Montreal Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1C5 Canada and Group on the Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract, Canadian Institute of Health Research and Department of Cellular Biology, Faculty of Medecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada and the Department of Medicine Hommersmith Hospital, London, W12 0NN, United Kingdom

Running Title: Colocalization of active MTP and apo B in the Golgi apparatus

Corresponding Address: Dr. Emile Levy
GI-Nutrition
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [redacted]

ABSTRACT

Although a critical role of microsomal transfer protein (MTP) has been recognized in the assembly of nascent apolipoprotein B (apo B)-containing lipoproteins, it remains unclear where and how it transfers lipids in the secretory pathway during the maturational process of apo B lipidation. The aims of this study were to determine whether MTP functions in the secretory pathway as well as in the endoplasmic reticulum and whether its large 97-kDa subunit interacts with the small 58-kDa protein disulfide isomerase (PDI) subunit and apo B, particularly in the Golgi apparatus. Using a high resolution immunogold approach combined with specific polyclonal antibodies, the large and small subunits of MTP were observed over the rough endoplasmic reticulum and the Golgi. Double immunocytochemical detection unraveled the colocalization of MTP and PDI as well as MTP and apo B in these same subcellular compartments. To confirm the spatial contact of these proteins, Golgi fractions were isolated, homogenized, and incubated with an anti-MTP large subunit antibody. Immunoprecipitates were applied on SDS-PAGE and then transferred on to nitrocellulose. Immunoblotting the membrane with PDI and apo B antibodies confirmed the colocalization of these proteins with MTP. Furthermore, MTP activity assay disclosed a substantial triglyceride transfer in the Golgi fractions. The occurrence of membrane-associated apo B in the Golgi, coupled with its interaction with active MTP, suggests an important role for the Golgi in the biogenesis of apo B-containing lipoproteins.

Supplementary Keywords: Enterocyte, intestinal epithelium, lipoproteins, intracellular transport, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus.

INTRODUCTION

Lipids constitute the most calorically dense dietary nutrients. They must undergo emulsification within the intestinal lumen, cell membrane permeation, intracellular esterification and incorporation into chylomicrons before reaching the circulatory system (for reviews, see Refs. 1-4). Despite significant progress, our understanding of the complex biosynthetic process involved in the formation and secretion of triglyceride-rich lipoprotein particles remains rather fragmentary. In particular, we know little about the sequential multistep assembly of apolipoproteins and lipids or the topology of the proteins in intracellular organelles implicated in lipoprotein production.

The study of naturally occuring mutations and genetic variations in humans has greatly contributed to the identification of proteins essential to the synthetic pathway and to the delineation of key metabolic mechanisms (5-11). Inherited disorders of apolipoprotein B (apo B) and microsomal transfer protein (MTP) deficiency, have provided a unique source for delineating, at least partially, the role of these specific proteins as well as the elucidating the intracellular mechanisms that result in lipid absorption and transport (5-11). The addition of core lipid to the nascent lipoprotein particle is thought to occur in conjunction with the translation and translocation of apo B in the ER (12-15). During this process, apo B remains tightly bound to the ER membrane,

where it is folded. The initial complement of lipid is then added to form a nascent small, dense lipoprotein particle. In the second step, maturation of the particle occurs by the addition of the neutral lipid core (16-17). Based upon the known lipid-transfer activity of MTP, its localization in the lumen of the ER, and the observation that apo B is degraded intracellularly and not secreted in the absence of MTP, it has been proposed that MTP shuttles lipids from the ER membrane to the growing apo B chain in the ER, allowing the protein to translocate completely into the lumen (18-20). However, very little is known about where and how the addition of bulk lipids to the nascent particle takes place.

Several models have been proposed for the formation of VLDL: (a) complete assembly of VLDL in the ER (21-23); (b) association of apo B with membranes until it reaches the Golgi apparatus, whereupon lipid is added to the particle (24-25); and (c) a sequential addition of lipid to apo B during its passage from the ER to the Golgi for secretion (26-28). If partial assembly takes place in the Golgi and additional core lipids and phospholipids are added in the pre-Golgi and Golgi as has been suggested (25, 29), one would anticipate the obligatory presence of MTP in these compartments.

Structurally, MTP is a heterodimer composed of a unique large subunit (97 kDa) and a smaller subunit (58 kDa) (30-33). The latter has been identified as the multifunctional enzyme protein disulfide isomerase (PDI). The role of PDI in the function of MTP is not entirely clear. The two subunits form a tight complex and their dissociation eliminates MTP activity. The

intracellular location of MTP in the intestine has not been thoroughly elucidated. Subfractionation of crude liver homogenates suggested that MTP is located in hepatocellular microsomes (32, 33). Nevertheless, this finding was not confirmed by immunoelectron microscopy. In the present paper, the following issues are addressed: 1) Can MTP be found in secretory pathway sites other than the ER? 2) Does it occur alone or in close proximity to PDI in these compartments? 3) Does it colocalize with apo B? 4) If MTP can be detected in the Golgi apparatus, is it functional? 5) Can it facilitate apo B translocation from Golgi membranes? The answers to these questions provided by the experiments described herein help elucidate the mechanisms involved in the assembly and secretion of apo B-containing lipoproteins.

MATERIALS AND METHODS

Intestinal Specimens

Sprague Dawley rats were used for all experiments. Jejunal specimens were taken at the ligament of Treitz, washed and prepared for microscopy visualization. For the isolation of Golgi, the mucosa was scraped, homogenized and ultracentrifuged.

Tissue Preparation for Electron Microscopy

Intestinal specimens were fixed by immersion in 1% glutaraldehyde, 0.1M phosphate-buffered (pH 7.4) for 2 h at 4°C and embedded in Lowicryl K4M at -20°C, according to our previously described procedures (34). Tissue blocks

were examined by light microscopy to select well oriented villus tips. Thin sections (60-80 nm) of the different tissue blocks were mounted on nickel grids with a carbon-coated Parlodion film and processed for immunocytochemistry.

Immunocytochemical Labeling

Protein A-gold immunocytochemical techniques were employed to detect the presence of MTP, PDI and apo B in rat intestinal tissue, as we described previously (34,35). Briefly, the tissue sections were washed initially in distilled water, incubated for 5 min on a drop of PBS containing 1% ovalbumin, and transferred subsequently to a drop of the PBS-diluted antibody (see below). After incubation (90 min) at room temperature, the grids were rinsed with PBS to remove unbound antibodies. They were transferred to the PBS ovalbumin (3 min) and incubated on a drop of protein A-gold (pH 7.2) for 30 min at room temperature. The tissue sections were then thoroughly washed with PBS, rinsed with distilled water and dried. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination with a Philips 410 electron microscope. Polyclonal antibodies were used at various dilutions (MTP 1/100, MTP large subunit 1/50, PDI 1/10, apo B 1/100) in combination with protein A-gold complexes, which were prepared using 10-nm or 5-nm gold particles according to our established techniques (35,36). Control experiments were performed to assess the specificity of the results. Excess purified MTP (10-fold) was added to the antibody solution. Incubation

with this solution was followed by the protein A-gold complex. Pre-immune rabbit serum (diluted 1:10) was used on tissue sections before incubation with protein A-gold complex. Incubations were also performed with the protein A-gold complex alone, omitting the antibody step to test for nonspecific adsorption of the protein A-gold complex to tissue sections (36).

Double-labeling Technique

In order to reveal the existence of MTP-PDI as well as MTP-Apo B complexes within the cellular compartments, the double labeling technique was applied. The tissue sections were labeled simultaneously for either MTP and PDI, or MTP and Apo B. The two-phase labeling technique (36,37) was applied to avoid any cross-reaction between reagents. The small protein A gold complex (5 nm) was used for the first labeling protocol, and, the larger 10 nm protein A gold complex was used for the second. This protocol allows for the simultaneous visualization of two antigens (MTP and PDI or MTP and Apo B) in the same tissue section.

Antibodies

The antibodies for MTP, PDI and MTP large subunit were kindly provided by John Wetterau, Harris Jamil and one of the authors (Carol Shoulders). These antibodies have been characterized and utilized successfully in previous studies (7,31,38,39). The antibody directed against rat apo B was raised in rabbits (35). Confirmation of the specificity of the antibodies was obtained when: 1) MTP large and small subunits as well as

apo B from total homogenate were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with each polyclonal antibody; and 2) cellular lysates were first reacted with the antibodies (directed against large MTP subunit, small MTP subunit and apo B antibodies) before the immunoprecipitates were subjected to gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and reacted with the underlying antibodies.

Microsomes and Golgi Fractions

Microsomal and Golgi fractions were prepared from enterocytes of fasted rats using modifications of reported techniques (40,41). Epithelial cells were homogenized (25%, w/v) in 0.25 M sucrose in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 25 mM KCl) containing protease inhibitors (10 µg/ml leupeptin, 10 µg aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml antipain and 25 mM 4-aminophenyl-methanesulfonyl fluoride) using a polytron (Brinkmann Instruments) at a setting of 1 (30 sec). The homogenate from a group of animals was used to prepare microsomes representative of the endoplasmic reticulum (40). For the preparation of Golgi fractions, the homogenate from another group of animals was filtered through cheesecloth and then adjusted (150 parts homogenate and 95 parts 2M sucrose in the aforementioned buffer) to a final concentration of 1.07 M sucrose. The adjusted homogenate (19 ml/tube) was loaded into Beckman SW 28 tubes; 9 ml each of 0.9 and 0.2 M sucrose in the aforementioned buffer were then sequentially overlaid above the homogenate. The tubes were subsequently centrifuged in an SW 28 rotor

for 2 h at 83,000 x g. Golgi fractions were collected at the 0.2/0.9 M sucrose interface.

To prepare Golgi membranes, Golgi fractions were mixed 1:1 (v/v) with the buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM KCl and the protease inhibitors as indicated above) with 20% glycerol and centrifuged for 90 min at 200,000 x g. Golgi membrane pellets were resuspended at 5% of their original volume in 0.25M sucrose in the same buffer. Golgi membranes were solubilized with either 1% Igepal CA 630 (a Nonidet P-40 equivalent from Sigma) or 1% CHAPS and 0.2% Triton X-100-containing buffer. The extract was then centrifuged at 200,000 x g, and the pellet discarded. The purity of Golgi subcellular fraction was verified by assay of galactosyltransferase, a specific marker for Golgi organelles, and glucose-6-phosphatase, a marker for the ER.

Purification of Transfer Protein

The intestinal ER and Golgi specimens were sonicated in 1 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing saponin (100 µg/ml) and protease inhibitors (leupeptin 10 µg/ml, Trasylol 10 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml). The MTP/PDI heterodimer was separated by ultracentrifugation (100,000xg) and concentrated using a Centricon 30 cartridge (5000 rpm x 30 min).

MTP Activity Assay

The triglyceride transfer assay was adapted from previous reports (30,39,42). The MTP transfer activity was determined by evaluating the

transfer of radiolabeled triacylglycerol between two populations of unilamellar vesicles, as described (30,39,43). The donor and receiver vesicles were prepared by adding the appropriate amount of lipids to 500 µl of chloroform, followed by drying under a stream of nitrogen, rehydration and probe-sonication in 1.25 ml of 15:35 buffer (15 mM Tris/HCl, pH 7.4, 35 mM NaCl, 0.05% bovine serum albumin, 3 mM sodium azide, 1 mM EDTA). Donor vesicles contained, per assay, 4 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.33 nmol of cardiolipin and 0.024 nmol of [^{3}H]-trioleylglycerol (Amersham Biosciences). Receptor vesicles contained 24 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.048 nmol of trioleylglycerol and ~4000 cpm [^{14}C] dipalmitoyl phosphatidylcholine ([^{14}C]-DPPC) (Amersham Biosciences). Both categories of vesicles comprised 0.01% butylated hydroxytoluene. Various amounts of semi-purified MTP were incubated with 5 µl donor and receptor vesicles in a final volume of 100 µl, for 1 h, at 37°C. The reaction was quenched by adding 400 µl of ice-cold 15:35 buffer (without bovine serum albumin). The negatively charged (due to the presence of cardiolipin) donor vesicles were removed from the reaction mixture by adsorption onto DEAE-cellulose (Whatman DE-52). The supernatant (containing the receptor vesicles) was collected after a low-speed centrifugation (13000xg) and recentrifuged (13000xg) to assure a total removal of the DEAE-cellulose before scintillation counting. A blank assay containing donor and acceptor membranes without transferred protein was used to correct for the spontaneous transfer of labeling between vesicles. The ratio of [^{3}H]-glycerol trioleate on [^{14}C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine was determined and the

percentage of lipid transfer was calculated from the increase in this ratio. Lipid transfer activity was determined from the initial linear portions of the activity curves.

In vitro Experiments with BMS-200150

Apo B synthesis was assessed in everted rat intestine, as described previously (44). Then, 300 μCi of [^{35}S]-methionine was added to the RPMI-1640 medium for 1 h. The medium was removed, and the intestine was washed and again incubated for 2 h with medium containing 10 mM unlabeled methionine in the presence or absence of 15 μM BMS-200150, an inhibitor of MTP. Labeled apo B from membranes and the luminal contents of isolated microsomal and Golgi fractions was immunoprecipitated, subjected to SDS-PAGE electrophoresis, excised from the gel and counted (45).

RESULTS

The first step in our studies was to test the specificity of the polyclonal antibodies that were generously provided by investigators (see "Acknowledgments") who remarkably advanced the knowledge of MTP. By immunoprecipitating epithelial cell lysates, separating the immunoprecipitates on SDS-PAGE, and Western blotting them separately with large 97-kDa and small 58-kDa antibodies, we identified the expected 97-kDa and 58-kDa subunits corresponding to MTP and PDI components, respectively (Fig. 1A). The use of polyclonal antibodies directed against the whole MTP complex resulted in the recovery of both MTP and PDI subunits (Fig. 1A). Similar experimental procedures displayed and confirmed the specificity of anti-apo B antibodies (Fig. 1A). In a second step, the specificity of antibodies was verified by fractionating total homogenate by SDS-PAGE, transferring to nitrocullose and immunoblotting. Once again, we found only the signal corresponding to the targeted protein (Fig. 1B).

We subsequently used immunocytochemical techniques and isolated microsomal and Golgi fractions to reveal the presence of MTP in these subcellular compartments. The purity of microsomal and Golgi fractions was determined by the assay of galactosyltransferase, as a specific marker for Golgi membranes, and glucose-6-phosphatase as a marker for the ER. The results of marker protein assays from a typical fractionation are shown in Table I. The Golgi fraction was enriched 96-fold with UDP-galactose

galactosyltransferase specific activity over cell homogenate, whereas glucose-6-phosphatase activity was very low (1.26-fold) in this cell organelle. Furthermore, the rough ER-derived fraction was enriched 3.8-fold in the specific activity of glucose-6-phosphotase and 2.46-fold in that of galactosyltransferase.

Immunocytochemical Detection of MTP and PDI

An anti-MTP heterodimer antibody was initially applied to define the immunocytochemical pattern of labeling in enterocytes (Fig. 2).The ultrastructural analysis of rat enterocytes revealed significant labelings over the rough ER, the Golgi area and basolateral membranes (Fig. 2). The trans-Golgi cisternae were more intensely labeled. Finally, the gold particles in the basal region of the enterocyte were associated with the basolateral membrane and its interdigitations (Fig. 2). Only very few particles were located over the mitochondria and nuclei.

Control experiments confirmed the specificity of these results. The preadsorbtion of the antibody with its antigen prior to performing immunocytochemical detection resulted in very low labeling in all cellular regions (Fig. 3). Similar data were obtained with the other control experiments, confirming the validity of the morphological findings. Furthermore, the addition of albumin to the antibody solution did not alter the pattern of labeling.

The antibody used in this first series of experiments recognizes the whole 97-kDa-58-kDa MTP protein complex. We therefore attempted to

distinguish between the two subunits by employing anitibodies specific to the 97-kDa and to the 58-kDa polypeptides separately. With the antibody directed against the MTP large subunit, the distribution of the labeling (Fig. 4) over the rough ER and the Golgi apparatus was qualitatively identical to that recorded for the entire MTP complex, as illustrated in Figure 2. A similar distribution was observed when anti-PDI antibody was utilized (Fig. 5). Again, negligible labeling was noted with control experiments (data not shown).

Double Immunocytochemical Detection of MTP & PDI as well as MTP & Apo B

The interaction of MTP with PDI is required for the production of the soluble, active MTP complex (33), which in turn is crucial for the assembly of apo B-containing lipoproteins (7, 8, 18, 19). In addition to demonstrating their labeling in the secretory pathway, as described above, we assessed their ultrastructural colocalization using double immunocytochemical detection. MTP was revealed by 10-nm protein A-gold, while PDI was shown using 5-nm protein A-gold (Fig. 6). Both particles were present over the rough ER and the Golgi area, and many of them in very close association. Only very few gold particles were detected over nuclei and mitochondria. These data provide evidence for the presence of MTP-PDI complexes not only in rough ER, but also in the Golgi apparatus.

Double immunocytochemical detection of the large subunit of MTP and apo B was also investigated in the rat jejunal enterocytes (Fig. 7). MTP and apo B were revealed by 10-nm and 5-nm protein A-gold complexes,

respectively. Numerous doublets, formed by large and small gold particles, were found over the Golgi area, suggesting that MTP and apo B are colocalized and associated in the same cellular compartments of the enterocyte. It must be noted that only a certain percentage of the gold particles revealing a large MTP subunit or PDI appear colocalized. This may be due to numerous factors, such as the ubiquitous nature of PDI, which fulfills various functions in other locations intrinsic to the ER, and technical limitations stemming from immunogold itself.

Interaction of MTP Large Subunit with PDI and Apo B in the Golgi

The aforementioned ultrastructural studies demonstrated the presence of MTP complex and the colocalization of its two subunits in the Golgi apparatus. Additional studies were carried out to assess its function in this subcellular compartment. Because the association of PDI (58-kDa) with MTP large subunit (97 kDa) is necessary to maintain the catalytically active form of the triacylglycerol transfer protein and to prevent the aggregation of the 97-kDa component, we examined their physical interaction. For this purpose, Golgi fractions were isolated and homogenized in a nondenaturing buffer. Immunoprecipitation was also carried out with an anti-MTP large subunit antibody under nondenaturing conditions. The immunoprecipitates were run onto SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting the membrane with anti-PDI antibody confirmed the presence of PDI (Fig. 8A). Thus, anti-MTP large subunit appeared to precipitate PDI, whereas MTP antibodies recognized MTP large subunit (Fig. 8B), indicating

an interaction between the MTP large subunit and PDI in the Golgi. In a second step, MTP activity was measured after setting up the assay in order to defining the optimal conditions; i.e. incubation time, protein linearity, backfound transfer in the absence of MTP and recovery of acceptor vesicles. The assay disclosed substantial triacyglycerol transfer activity in the Golgi fraction compared to that of microsomes (Fig. 9). Together these findings indicate that the MTP complex is present in the Golgi and that it maintains its capacity to transfer triacyglycerol in that organelle. Finally, based on the protein recovery of isolated organelles, intestinal microsomes and Golgi fractions represented 64% and 46%, respectively, of total cellular MTP activity.

Immunoblotting experiments were performed to confirm the spatial contact of MTP with apo B in the Golgi fractions. Immunoprecipitation was carried out with the antibody directed against the large MTP subunit. The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred onto a MTP nitrocellulose membrane. The latter was blotted with anti-apo B antibodies. As shown in Figure 8C, no apo B was visualized with nonimmune sera, whereas it was clearly detected with anti-apo B antibody. These observations are consistent with the aforementioned ultrastructural findings illustrating the colocalization of MTP with apo B.

Finally, Golgi fractions were exposed to nonimmune serum or anti-apo B antibodies. The immunoprecipitate was run on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with MTP large

subunit antibody. MTP large subunit (97 kDa) was detected in the anti-apo B immunoprecipitate, but not in the nonimmune precipitate (Fig. 10).

Presence of Apo B in the Golgi Membrane

The presence of apo B in the Golgi may be derived from apo B-containing lipoprotein transit from the rough ER or from its close association with the Golgi membrane. To demonstrate that apo B is a resident membrane protein of the Golgi apparatus, membranes were isolated, immunoprecipitated with anti-apo B antiserum, applied on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Again, we used galactosyltransferase as a marker of Golgi membranes and the overall enrichment of its specific activity was 133-fold. Anti-apo B antibodies revealed the presence of apo B, suggesting that apo B is associated with Golgi membranes (Fig. 11).

Elimination of any Possibility of MTP Leakage from the ER to the Golgi

Immunocytochemical labeling has demonstrated the presence of MTP, not only in the ER, but also in the Golgi apparatus. In order to demonstrate that the finding of MTP in the Golgi is not merely the result of leakage from the ER, two approaches were adopted. First, a quantitative estimation was achieved in order to compare protein enrichment in the Golgi and ER. To this end, about 50 fields from the Golgi-ER area were examined at X16,500 magnification and MTP labeling densities in each cellular compartment were evaluated by morphometrical methods (36). The calculated mean ratio value

between the Golgi and ER was found to be 2.72, showing MTP enrichment in the Golgi apparatus and the concentration process taking place in this organelle. Second, an ER-resident protein, namely the Grp78(Bip), was revealed by immunocytochemistry. Specific labeling was obtained over the rough ER of the enterocytes, whereas only a very few gold particles were detected at the level of the Golgi apparatus (results not shown), confirmed by the calculated mean ration value (0.33) between the Golgi and ER labeling. Altogether, these data indicate that leakage from the ER to the Golgi is negligible.

Role of MTP in Apo B Movement

In further experiments, we investigated the effects of MTP inactivation by BMS-200150 on the behavior pattern of newly synthesized apo B in the membranes and lumenal contents of both microsomal and Golgi fractions (Table II). Apo B disappeared more rapidly from the microsomal and Golgi membranes after a 2-h chase period than a 1-h pulse. However, with the inactivation of MTP, a delay was noted in the removal of newly synthesized apo B from microsomal and Golgi membranes. In addition, little effect of the MTP inhibitor was observed on the disappearance of apo B from the lumen of the two subcellular compartments. These experiments suggest that MTP protects apo B against co-translational degradation.

DISCUSSION

Most of the studies undertaken to delineate the role of MTP in the assembly of apo B-containing lipoproteins have suggested that the ER

represents its site of action, in view of its involvement in the biogenesis of triglyceride-rich lipoproteins. It was previously unknown whether MTP is found in other subcellular organelles in the small gut. The present investigation examined the intracellular distribution of the large subunit of MTP along with PDI and apo B in the rat small intestine. Our data revealed that, at the electron microscope level, MTP is present particularly in the rough ER and the Golgi apparatus of the absorptive epithelial cells. Double immunocytochemical labeling demonstrated the co-localization of the MTP large subunit with PDI and apo B. The biochemical analyses not only confirmed the ultrastructural studies, but also demonstrated the association between the MTP large subunit and PDI in the Golgi, the preservation of its transfer activity, and its interaction with apo B. These observations suggest that this organelle likely represents a site active in triglyceride-rich lipoprotein assembly.

PDI and the MTP large subunit are not covalently linked in the heterodimer, but they form a highly stable protein complex (31). The spatial contact of the large subunit with PDI is necessary to maintain the transfer protein in a nonaggregated and catalytically active form (30-33). Data in the present study documented the presence of the 58-kDa and 97-kDa subunits of MTP in basolateral membranes. Even if our ultrastructural experiments showed that the two subunits seem in close physical proximity we are not able to indicate at this point whether basolateral membranes contain active MTP. Another puzzling question is whether MTP accompanies lipoproteins to

this subcellular area. Experiments from our laboratory have shown that freshly isolated lipoproteins from the blood circulation are devoid of MTP (results not shown), suggesting that the latter does not exit the cell. Confirming data were obtained in Caco-2 cells when we were not able to detect any MTP signal by Western blot or by TG transfer activity at the basolateral medium. Currently, it is not clear whether MTP/PDI complex plays not only a key role in triglyceride-rich lipoprotein assembly but also functions as a chaperone, to facilitate the secretion of chylomicrons and VLDL.

Much of our knowledge concerning apo B synthesis and lipoprotein assembly stems from studies using hepatocytes, including human and rat hepatoma cells, McA-RH7777 cells and primary hepatocytes (13,18-20,46). These hepatic models generally produce both apo B-48 and apo B-100. The lipidation of apo B is thought occur in two phases (16,17). Initially, the stabilization of apo B necessitates an association with a small quantity of neutral lipids, which protects it from misfolding and degradation. The second step is characterized by the bulk transfer of triacylglycerol to the secretion-competent form of apo B, resulting in the production of mature particles of VLDL. MTP has been shown to transport lipid from the ER membrane to apo B in the lumen of the ER (7,8,19,39,45). This process may be promoted by a physical interaction between MTP and apo B (46). Our results show that MTP is also located in the Golgi apparatus of rat intestine in its active form and that it interacts with apo B locally, as was demonstrated in the ER by Wu *et al.* (46) and Patel and Grundy (47).

The requirement of lipid transfer activity in the assembly of apo B-containing lipoproteins has been underscored by genetic disorders and various molecular studies. Evidence has been presented for protein-protein interactions between apo B and MTP, which may be crucial for the transfer of lipids to apo B during its translocation or may indicate a chaperone-like activity for MTP in apo B folding, assembly and secretion. The binding sites involved in these interactions have recently been proposed (49,50). On the other hand, PDI has been shown to associate with MTP to maintain the MTP complex in a soluble state (30-33). Since PDI contains the "KDEL" ER-retention sequence, it might anchor the MTP complex in the ER, at the site of apo B translocation (51). Additional studies are required to determine whether most of these events occur in the Golgi apparatus.

The occurrence of membrane-associated apo B in the Golgi, coupled with its interaction with active MTP, suggests an important role for the Golgi in the assembly of apo B-containing lipoproteins. Although direct evidence for such a hypothesis is lacking, earlier reports proposed a pivotal role for the Golgi in the formation of triglyceride-rich lipoproteins. Bamberger and Lane (24, 25) reported that ~50% of apo B is membrane-associated in both the ER and the Golgi in chicken liver. Using pulse-chase experiments, they concluded that the assembly of triacylglycerol with apolipoproteins occurs in the Golgi. Similarly, Higgins suggested that the *trans*-Golgi region is the major intracellular site for the assembly of apo B with triacylglycerol and phospholipid (52). Furthermore, Olofsson *et al.* (53) emphasized that a

substantial portion of the oligosaccharide chains of apo B, along with various posttranslational modifications of both lipid and apolipoprotein moieties, is processed in the Golgi. Accordingly, our data showed that MTP inactivation by BMS-200150 delayed the net removal of newly synthesized apo B from the microsomal and Golgi membranes but not from the corresponding lumenal compartments. Similar findings were reported in the liver by Hebbachi *and colleagues* (54,55). It seems, therefore, that the association of apo B with lipid components requires active MTP in both the microsomal and Golgi membranes in order to allow the secretion-competent form of apo B to form chylomicrons in the enterocyte. Taken together, these observations point to the important role of the Golgi in the assembly of apo B-containing lipoproteins, as suggested by our results herein.

How do our ultrastructural findings and biochemical data fit the two-phase process for apo B core lipidation? It is possible that nascent apo B-48 HDL particles, originating in the ER, are supplied with neutral lipid droplets at the junction of the rough and smooth ER, as proposed by many investigators (for review, see Ref. 4). However, we cannot exclude the possibility that lipid loading is completed in the Golgi compartment. During the continuous maturation process, MTP may shuttle lipids from the Golgi membrane or from locally available lipid droplets to the growing apo B-containing lipoprotein particles. As noted above, a considerable body of literature supports a key role of the Golgi in triglyceride-rich lipoprotein assembly and phospholipid acquisition (52,53). On the other hand, we observed the lipid transfer protein

activity of MTP in the Golgi as well as its localization to the lumen of Golgi and its association with apo B at this site. One may thus suggest that the Golgi apparatus represents an additional site where MTP enables nascent apo B to attain a secretable conformation by providing sufficient triacylglycerol for the formation of a neutral lipid core. The process may be promoted by a physical interaction between MTP and apo B. This hypothesis is consistent with the recent observations relative to: (a) the heavy labeling of Golgi membrane for apo B following radioactivity pulses (54,55); (b) Golgi-mediated degradation of apo B (56-58); and (c) the delay of apo B removal from the Golgi membrane following MTP inhibition with BMS-200150 (55). In our studies, the possibility of substantial contamination of Golgi membranes with microsomes was ruled out by the quantification of marker enzymes (59). Moreover, potential major MTP leakage from the ER to the Golgi apparatus was rejected by appropriate immunocytochemical studies. Thus, the Golgi may represent an additional important site for lipoprotein assembly. Nevertheless, many experiments must be carried out in order to determine the precise function of MTP in the Golgi and the role in this organelle in apo B-containing lipoprotein assembly.

In summary, the present investigation demonstrates the presence of MTP in subcellular compartments associated with the secretory pathway other than the ER. Furthermore, the colocalization of functional MTP and the membrane-associated apo B in the Golgi fraction strongly suggests a role of

the Golgi apparatus in the assembly or maturation of intestinal TG-rich lipoproteins.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Drs. JR Wetterau and H Jamil for the polyclonal antibodies. We also acknowledge the expert secretarial assistance of Danielle St-Cyr Huot.

LEGENDS

Figure 1: **Antibody Specificity**. Two techniques were utilized: A, Cellular lysates were separately reacted with the antibodies directed against MTP, PDI and apo B. The immunoprecipitates were subjected to gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Thereafter, the latter were blotted with large 97-kDa MTP subunit antibodies, small 58-kDa MTP subunit (PDI) antibodies or apo B antibodies; B, Lomogenate was fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with each polyclonal antibody. Molecular weight standards (ST) were used to identify the location of the proteins.

Figure 2: **Immunocytochemical detection of MTP in rat enterocytes**. Protein A-gold immunocytochemical technique was applied with the polyclonal antibody directed against heterodimer MTP/PDI to localize it in absorptive cells of rat jejunum. The labelling by gold particles revealed the antigenic sites of MTP/PDI heterodimer at the level of the rough ER (RER), Golgi apparatus (G) and the basolateral membrane (blm). Mitochondria (m) and nuclei (N) are devoid of labeling. Magnification X 40,000.

Figure 3: **Assessment of labeling specificity**. The tissue section was incubated with antigen-adsorbed-antibody against the MTP large subunit followed by the protein A-gold complex. The labeling by gold particles was drastically reduced, very few particles being present over the different cellular compartments. G, Golgi apparatus; RER, rough endoplasmic reticulum; m, mitochondria. Magnification X30,000.

Figure 4: **Immunocytochemical detection of the MTP large subunit in rat jejunal enterocytes.** A specific polyclonal antibody directed against the 97-kDa large subunit of MTP was employed in combination with protein A-gold. Labeling is present over the rough ER and the Golgi area (G), including small vesicles (v). Mitochondria (m) are devoid of labeling. Magnification A X 50,000. B X 30,000.

Figure 5: **Immunocytochemical detection of PDI in rat jejunal enterocytes.** Protein A-gold was used in combination with a specific polyclonal antibody directed against the small 57-kDa PDI subunit of MTP. Labeling is present over the rough ER (RER), the Golgi apparatus (G) and the basolateral membrane (blm). Magnification x 30,000

Figure 6: **Double immunocytochemical detection of MTP large subunit and PDI using corresponding specific antibodies and protein A-gold complexes of different sizes**. MTP large subunit is revealed by 10-nm protein A-gold, while PDI is visualized by 5-nm protein A-gold. Labeling for both antigens is present in the rough endolasmic reticulum (RER), Golgi (G) and basolateral membrane (blm). The association of both antigens is revealed by the formation of large and small gold particle doublets (some have been circled). Mitochondria (m) and nuclei (N) are devoid of labeling. Magnification A x 50,000; B x 30,000.

Figure 7: **Double immunocytochemical detection of MTP large subunit and apo B using the corresponding specific antibodies and the protein A-gold complexes formed by large and small gold particles**. MTP large subunit is revealed by 10-nm protein A-gold, whereas apo B is detected by 5-nm protein A-gold complex. Labeling for both antigens is present over the Golgi apparatus (G). The association of both antigens

is revealed by the formation of large and small gold particle doublets (some of which are circled). Magnification x 45,000.

Figure 8: **Association of MTP large subunit with apo B and PDI in the Golgi**. Golgi were disrupted with a nondenaturing buffer and immunoprecipitated with nonimmune serum or anti-MTP large subunit antibody (a-MTP(ls)). The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with either anti-PDI antibody (A), anti-MTP large subunit antibody (B) or anti-apo B antibody (C). In panel A, immunoblotting with anti-PDI antibody demonstrated that PDI co-precipitates by using anti-MTP large subunit antibody. In panel B, immunoblotting with anti-MTP large subunit antibody demonstrated that MTP large subunit was immunoprecipitated by using anti-MTP large subunit. In panel C, immunoblotting with anti-apo B antibody revealed that apo B co-immunoprecipitated with the large subunit of MTP.

Figure 9: **MTP activity in the Golgi fraction isolated from the enterocytes of rat jejunum**. Microsomal and Golgi fractions were prepared as described in Methods. MTP was quantified by measuring the rate of transfer of ^{3}H-labeled triglyceride from donor vesicles to acceptor vesicles prepared as reported under "Materials and Methods". The percentage of total activity (in histograms) was calculated as the proportion of the sum of microsomes and Golgi.

Figure 10: **Precipitation of MTP large subunit with apo B antibodies.** Golgi homogenate was immunoprecipitated with either nonimmune serum or anti-apo B antiserum (a-apo B). The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with anti-MTP large subunit [MTP (ls)].

Figure 11: **Apo B location in Golgi membranes**. Golgi membranes were prepared and incubated with non immune serum (lane 1) or anti-apo B antiserum (lanes 2-4). The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with anti- Apo B antiserum.

REFERENCES

1. Davidson, N.O. (1994) *Physiology of Gastrointestinal Tract.* Johnson, L.R., editor. Third edition. Raven Press, New York. 1909-1934

2. Tso, P. (1994) *Physiology of Gastroiantestinal Tract.* Johnson, L.R., editor. Third edition. Raven Press, New York. 1867-1907

3. Levy, E. (1992) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**, 413-419

4. Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., and Bakillah, A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 151-170

5. Levy, E. (1996) *Clin. Invest. Med.* **19**, 317-324

6. Levy, E., Marcel, R., Milne, R.W., Grey, V.L., and C. Roy. (1987) *Gastroenterology* **93**, 1119-1126

7. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J., and Gregg, R.E. (1992) *Science* **258**, 999-1001

8. Shoulders, C.C., Brett, D.J., Bayliss, J.D., Narcisi, T.M., Jarmuz, A., Grantham, T.T., Leoni, P.R., Bhattacharya, S., Pease, R.J., Collen, P.M., et al. (1993) *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2109-2116

9. Black, D.D., Hay, R.V., Rohwer-Nutter, P.L., Ellinas, H., Stephens, J.K Sherman, H., Teng, B.B., Whitington, P.F., and Davidson, N.O. (1991) *Gastroenterology* **101**, 520-528

10. Young, S.G., Krul, E.S., McCormick, S., Farese, R.V. Jr, and Linton, M.F. (1996) *Methods Enzymol.* **263**, 120-145

11. Wu, J., Kim, J., Li, Q., Kwok, P.-Y., Cole, T.G., Cefalu, B., Averna, M., and Schonfeld, G. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 955-959

12. Boren, J., Graham, L., Wettesten, M., Scott, J., White, A., and Olofsson, S.-O. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9858-9867

13. Rustaeus, S., Lindberg, K., Boren, J., and Olofsson, S.-O. (1995) J. Biol. Chem. **270**, 28879-28886

14. Spring, D.J., Chem-Liu, L.W., Chatterton, J.E., Elovson, J., and Schumaker, V.N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**,14839-14845

15. McLeod, R.S., Zhao, Y., Selby, S.L., Westerlund, J., and Yao, Z. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2852-2862

16. Swift, L.L. (1995) *J. Lipid Res.* **36**, 395-406

17. Boren, J., Rustaeus S., and Olofsson, S.-O. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25879-25888

18. Gordon, D.A., Jamil, H., Gregg, R.E., Olofsson, S.-O., and Boren, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33047-33053

19. Wang, Y., McLeod, R.S., and Yao, Z. (1997) *J. Biol. Chem.* **262**, 12272-12278

20. Benoist, F., and Grand-Perret, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20435-20442

21. Alexander, C.A., Hamilton, R.L., and Havel, R.J. (1976) *J. Cell. Biol.* **69**, 241-263

22. Borchardt, R.A., and Davis, R.A. (1987) *Biol. Chem.* **262**, 16394-16402

23. Rusinol, A., Verkade, H., and Vance, J.E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3555-3562

24. Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11868-11878

25. Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2390-2394

26. Bostrom, K., Boren, J., Wettesten, M., Sjoberg, A., Bondjers, G., Wiklund, O., Carlsson, P., and Olofsson, S.O. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4434-4442

27. Bostrom, K., Wettesten, M., Boren, J., Bondjers, G., Wiklund, O., and Olofsson, S.O. (1987) *J. Biol. Chem.* **261**, 13800-13806

28. Janero, D.R., and Lane, M.D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14496-14504

29. Hamilton, R.L., Moorehouse, A., and Havel, R.J. (1991) *J. Lipid Res.* **32**, 529-543

30. Wetterau, J.R., and Zilversmit, D.B. (1985) *Chem. Phys. Lipids* **38**, 205-222

31. Wetterau, J.R., Combs, K.A., Spinner, S.N., and Joiner, B.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9800-9807

32. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Laplaud, P.M., and McLean, L.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 4406-4412

33. Wetterau, J.R., Combs, K.A., McLean, L.R., Spinner, S.N., and Aggerbeck, L.P. (1991) *Biochemistry* **30**, 9728-9735

34. Bendayan, M. (1984) *J. Electron. Microsc. Tech.* **1**, 243-270

35. Levy, E., Rochette, C., Londono, I., Roy, C.C., Milne, R.W., Marcel, Y.L., and Bendayan, M. (1990) *J. Lipid Res.* **31**, 1937-1946

36. Bendayan, M. (1995) *Prog. Histochem. Cytochem.* **29**, 1-163

37. Bendayan, M. (1982) *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 81-85

38. Gordon, D.A., Jamil, H., Sharp, D., Mullaney, D., Yao, Z., Gregg, R., and Wetterau, J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7628-7632

39. Leiper, J.M., Mayliss, J.D., Perse, R.J., Brett, D.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21951-21954

40. Levy, E., Garofalo, C., Rouleau, T., Gavino, V., and Bendayan, M. (1996) *Hepatology* **23**, 848-857

41. Marks, D.L., Wu, K., Paul, P., Kamisaka, Y., Watanabe, R., and Pagano, R.E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 451-456

42. Narcisi, T.M., Shoulders, C.C., Chester, S.A., Read, J., Brett, D.J., Harrison, G.B., Grantham, T.T., Fox, M.F., Povey, S., de Bruin, T.W., Ekerlens, D.W., Muller, D.P.R., Lloyd, J.K., and Scott, J. (1995) *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1298-1310

43. Wetterau, J.R., Lin, M.C.M., and Jamil, H. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1345**, 136-150

44. Levy, E., Garofalo, C., Thibault, L., Dionne, S., Daoust, L., Lepage, G., Roy, C.C. (1992) Am.J.Physiol. 262:G319-G326, 1992

45. Levy, E., Sinnett, D., Thibault, L., Nguyen, T.D., Delvin, E., Ménard, D. (1996) FEBS Lett. 393:253-258

46. Gibbons, G.F. (1994) *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 191-199

47. Patel, S.B., and Grundy, S.M. (1996) *J. Biol. Chem.* **272**, 18686-18694

48. Wu, X., Zhou, M., Huang, L.-S., Wetterau, J., and Ginsberg, H.N. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10277-10281

49. Hussain, M.M., Bakillah, A., Nayak, N., and Shelness, G.S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25612-25615

50. Mann, C.J., Anderson, T.A., Read, J., Chester, .S.A., Harrison, G.B., Köchl, S., Ritchie, P.J. , Bradbury, P., Hussain, F.S., Amey, J., Vanloo, B., Rosseneu, M., Infante, R., Hancock, J.M., Levitt, D.G., Banaszak, L.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 391-408

51. Munro, S., and Pelham, H.R. (1987) *Cell* **48**, 899-907

52. Higgins, J.A. (1988) *FEBS Lett.* **232**, 405-408

53. Olofsson, S.O., Bjursell, G., Bostron, K., Carlsson, P., Elovson, J., Protter, A.A., Reuben, M.A., and Bondjers, G. (1987) *Atherosclerosis* **68**, 1-17

54. Hebbacchi, A.-M., and Gibbons, G.F. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* **1441**, 36-50

55. Hebbachi, A.-M., Brown, A.-M., and Gibbons, G.F. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 1758-1768

56. Verkade, H.J., Fast, D.G., Russīnol, A.E., Scraba, D.G., and Vance, D.E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24980-24996

57. Wang, C.-N., Hobman, T.C., and Brindley, D.N. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24924-24931

58. Fast, D.G., and Vance, D.E. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1258**, 159-168

59. Bruneau, N., Lombardo, G., Levy, E., Bendayan, M. (2000) Microsc. Res. Tech. 49:329-345

60. Little, E., Ramakrishman, M., Roy, B., Gazit, G., Lee, A.S. (1994) Crit Rev Eukar Gene Expr 4:1-19

Table 1: Specific activities of marker enzymes of subcellular fractions

Organelle	Galactosyltransferase	Glucose-6-phosphatase
	nmol/mg protein/min	
Whole homogenate	0.041 (x1.00)	0.720 (x1.00)
Microsomal fraction	0.101 (x2.46)	2.735 (x3.80)
Golgi fraction	3.926 (x95.75)	0.907 (x1.26)

Microsomal and Golgi subcellular fractions were prepared as described under "Materials and Methods". The purity of the organelle fractions was assessed by determining the specific activities of UDP-galactose galactosyltransferase and glucose-6-phosphatase. The enrichment of the marker enzymes in each cellular fraction was calculated by dividing the specific activity of the subcellular fraction by that of the homogenate (data are given in parentheses). The data represent the average of n=2.

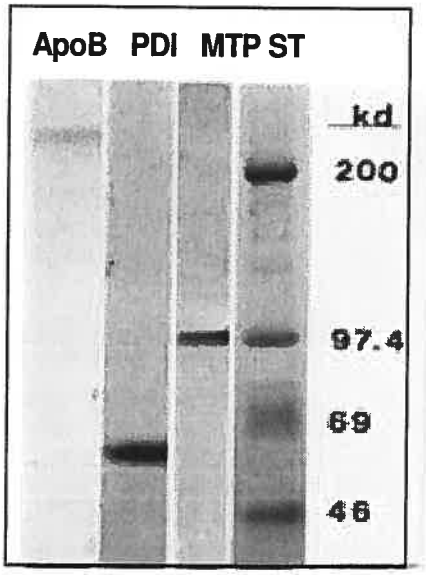
Table 2: Effect of MTP inhibitor on apo B from the microsomal and Golgi membranes and lumen

Time	Microsomes		Golgi	
(h)	membranes (dpm/mg protein)	lumen	membranes (dpm/mg protein)	Lumen
0	1688 (1503-1873)	1002 (801-1203)	2480 (2143-2817)	479 (393-565)
2 (-BMS)	631 (519-743)	494 (410-578)	1038 (818-1258)	234 (182-286)
2 (+BMS)	1070 (916-1224)	519 (465-573)	2351 (2006-2696)	288 (221-355)

Intestinal everted sacs were pulse-labeled with [^{35}S]-methionine for 1h and chased for 2h either in the presence or absence of BMS-200150. The subcellular organelles (microsomes and Golgi) were prepared, and labeled apo B was determined in isolated membranes and lumenal contents. Results are the mean of two experiments presented in parentheses.

Figure 1

A



B

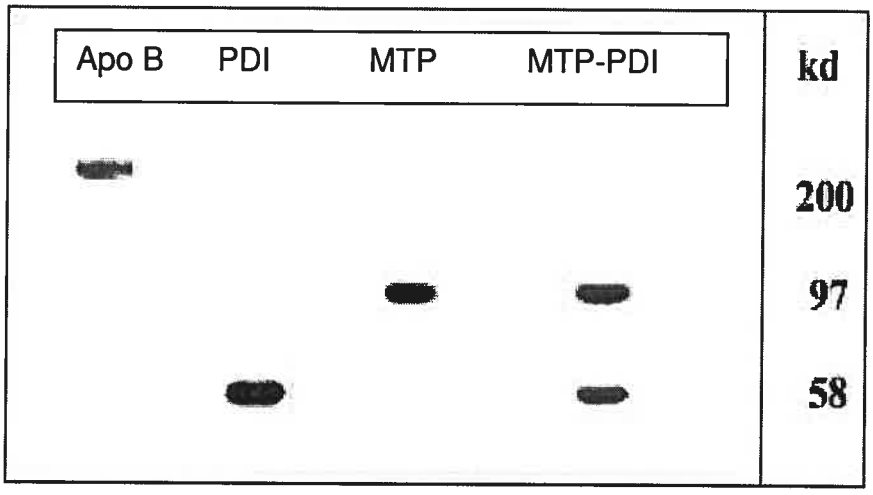


Figure2

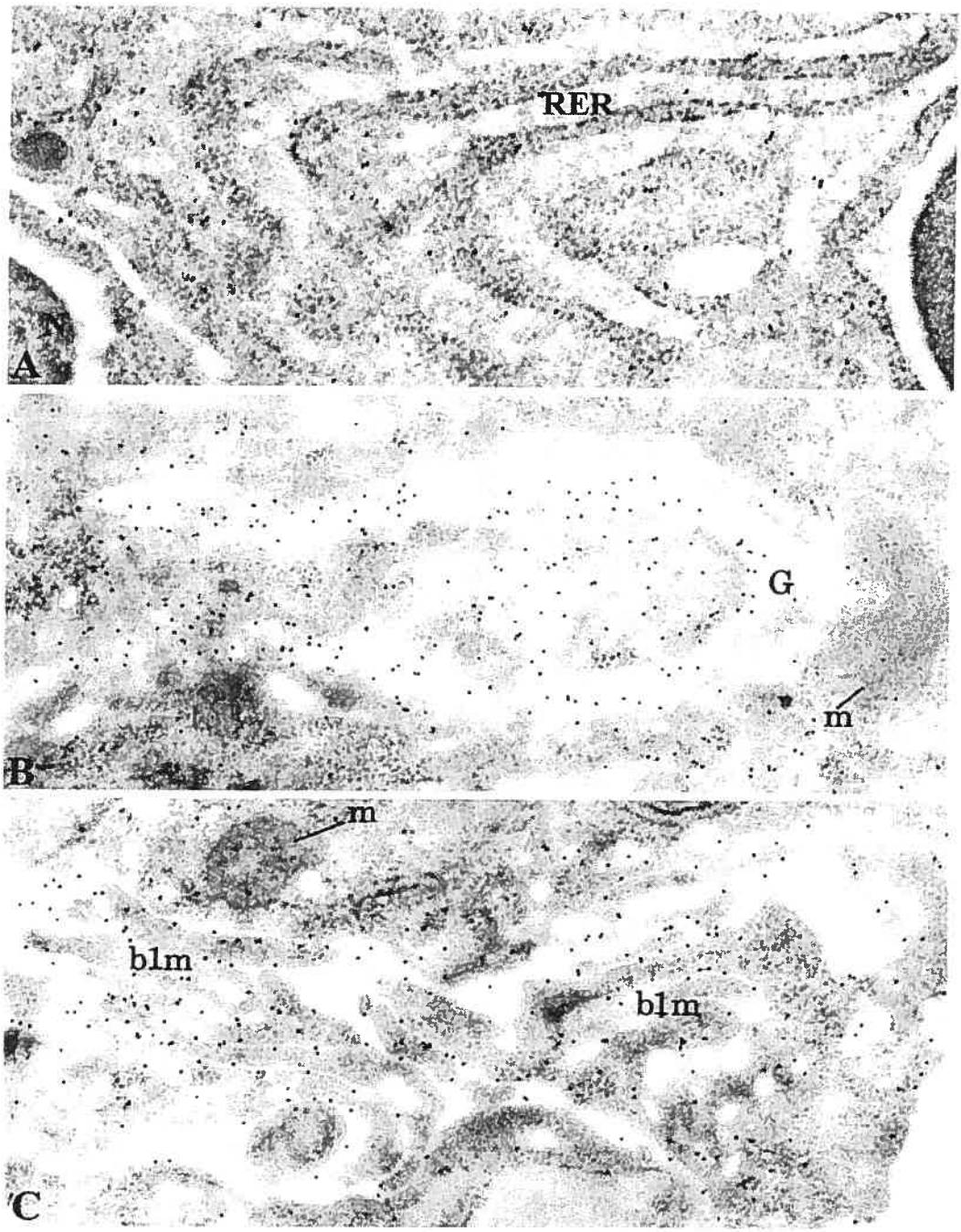


Figure 3

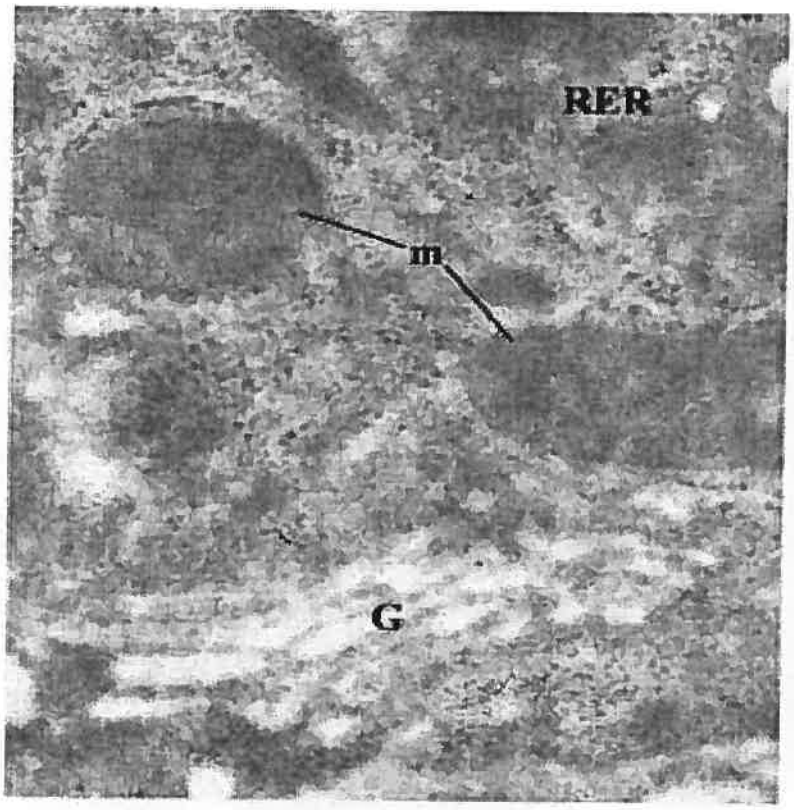


Figure 4

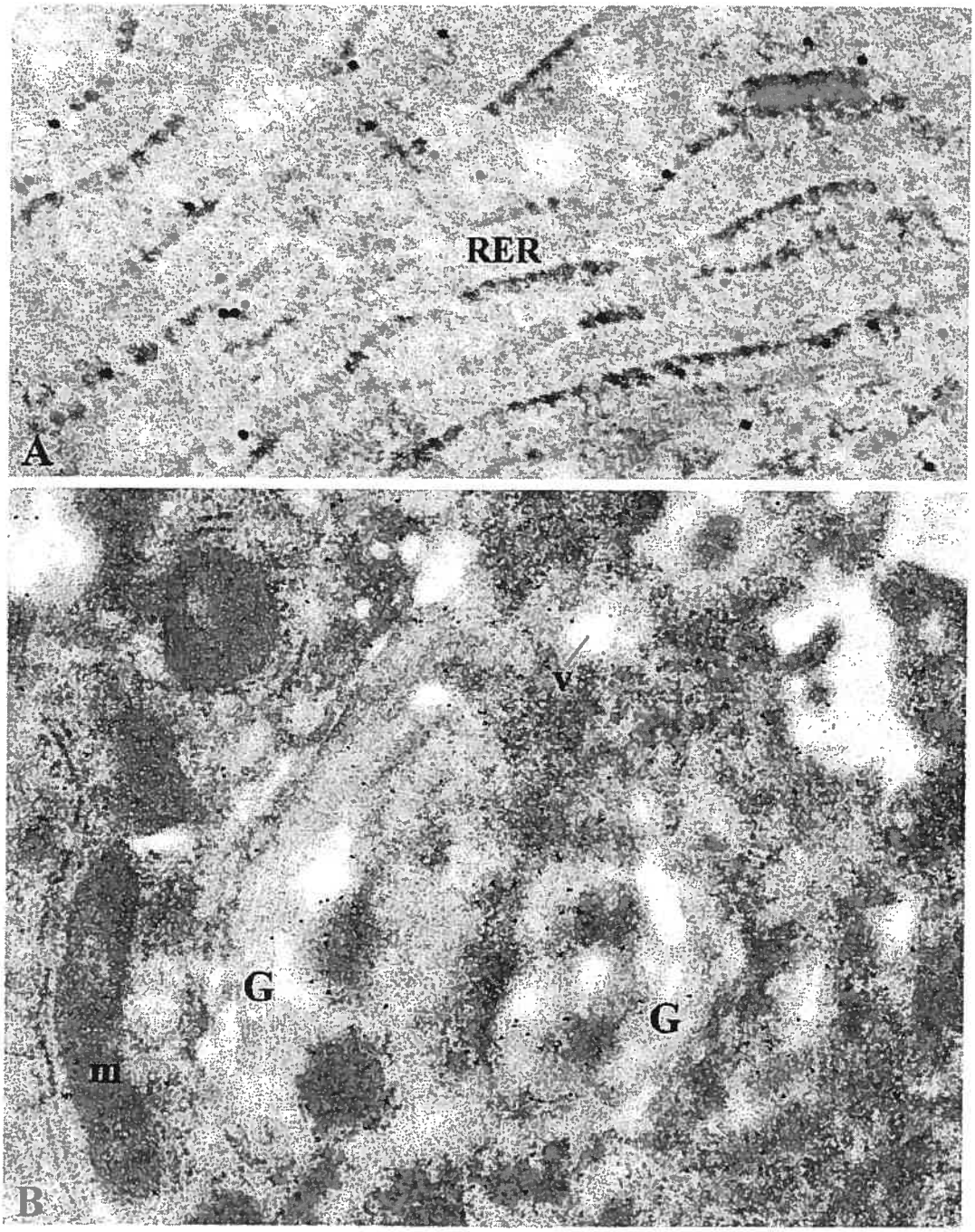


Figure 5

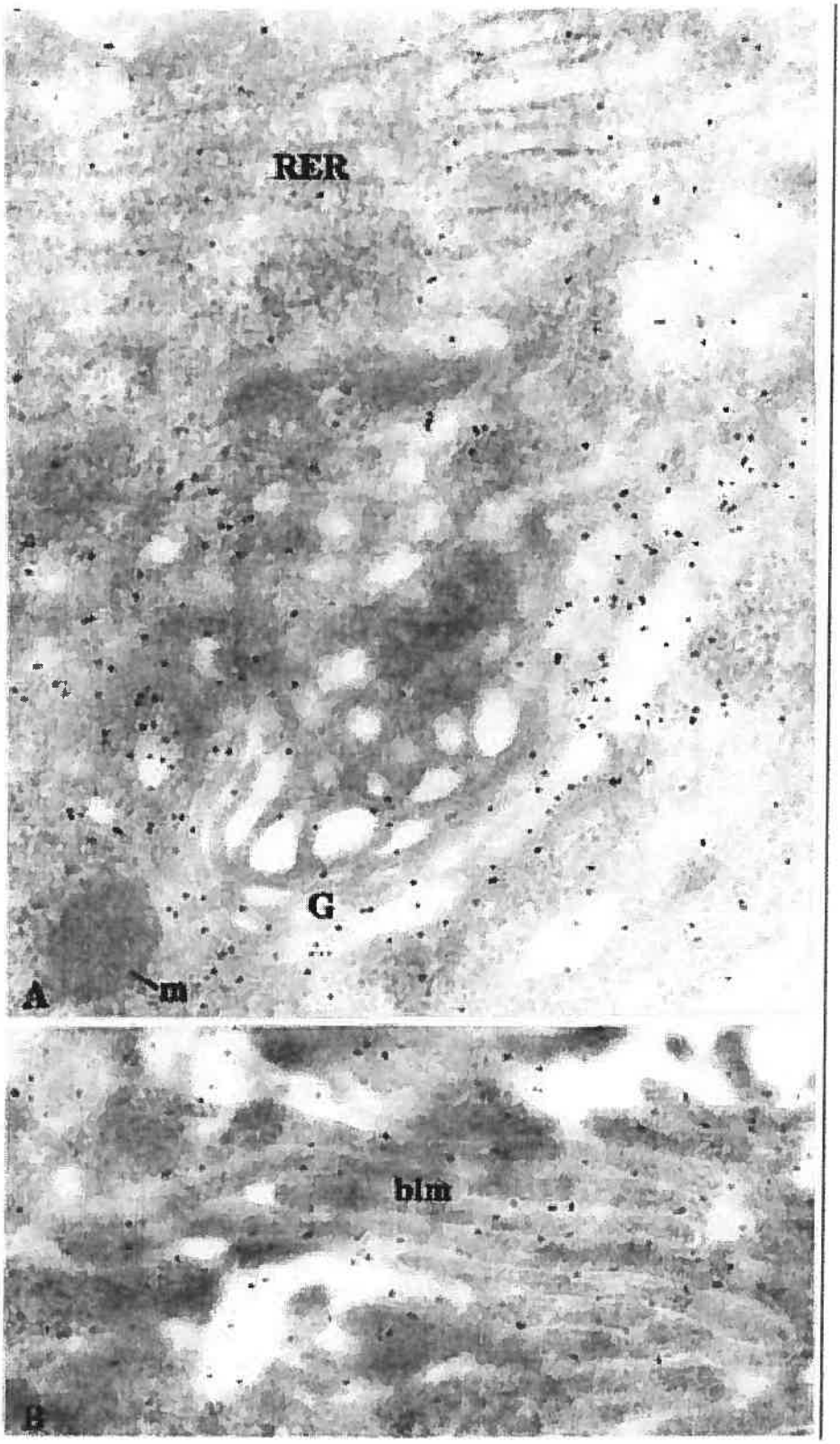


Figure 6

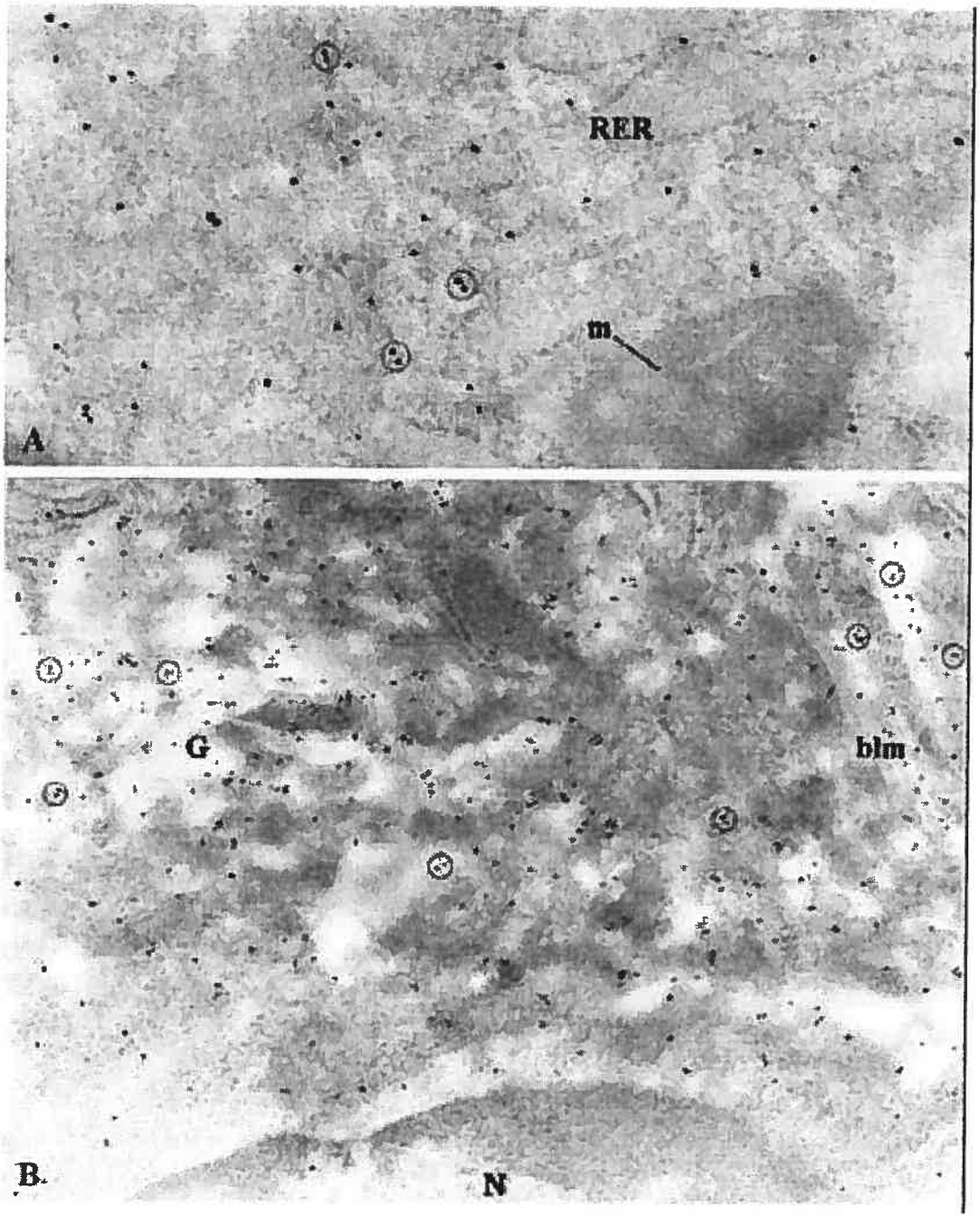


Figure 7

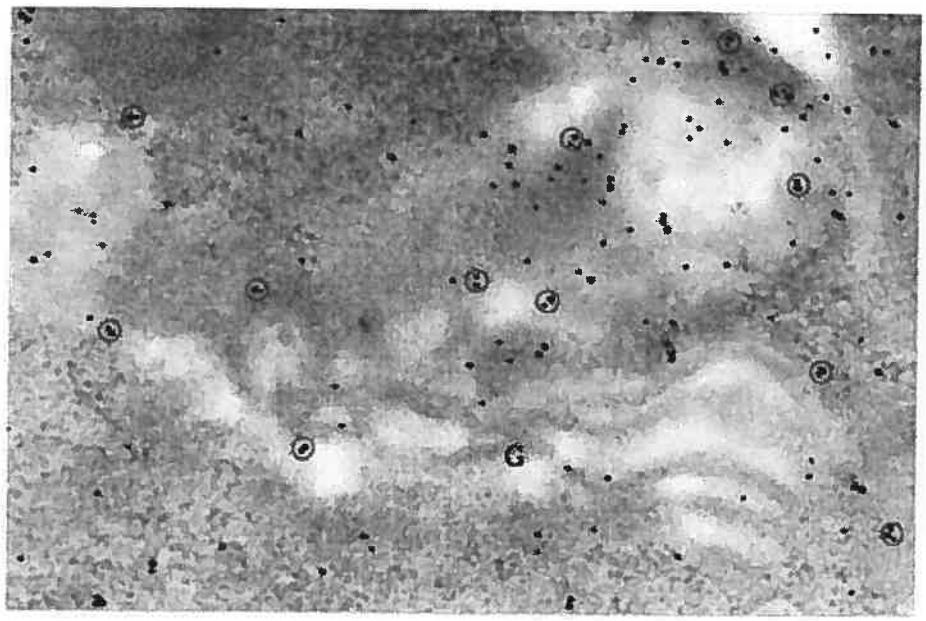


Figure 8

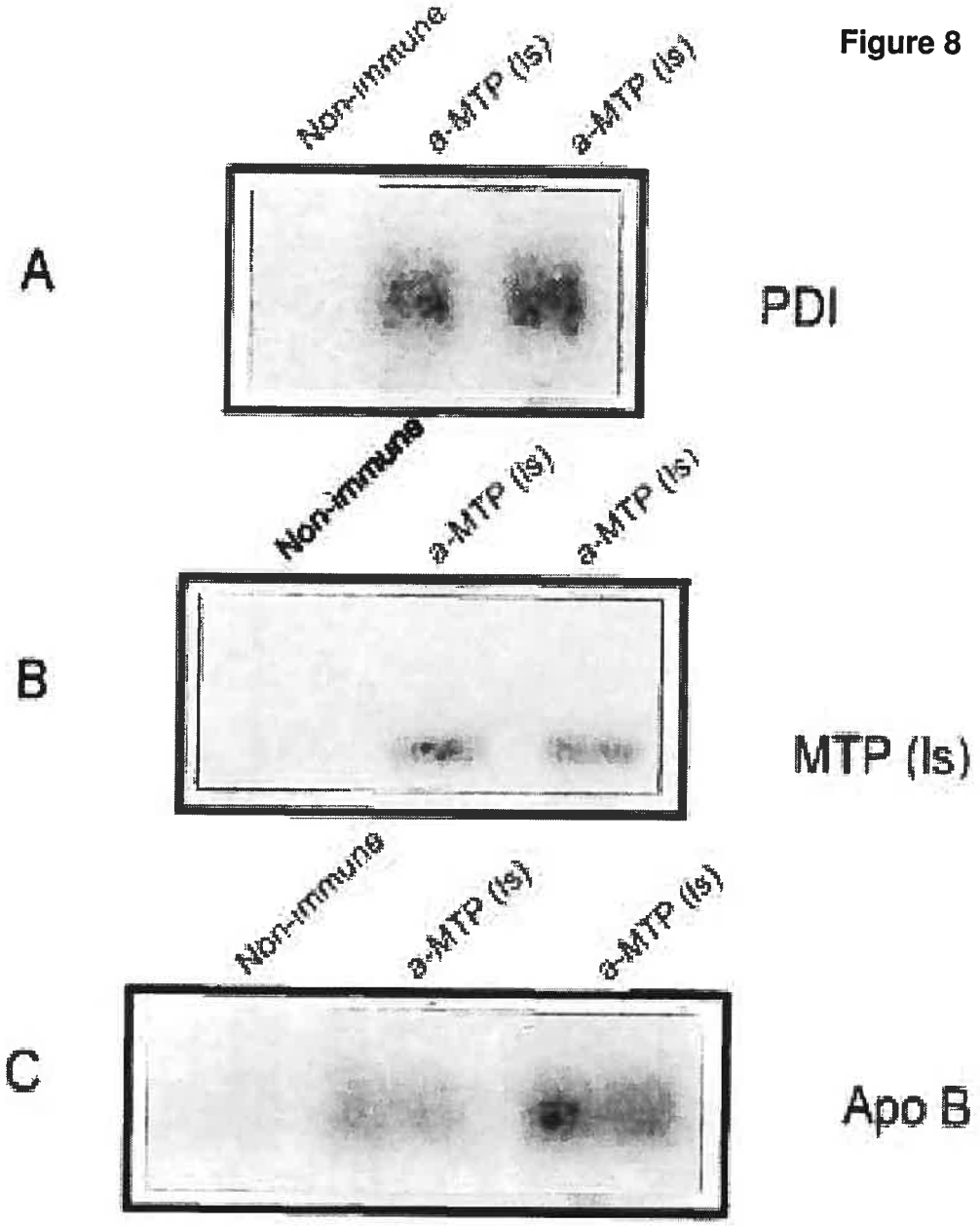

Non-immune
α-MTP (Is)
α-MTP (Is)
A
PDI
Non-immune
α-MTP (Is)
α-MTP (Is)
B
MTP (Is)
Non-immune
α-MTP (Is)
α-MTP (Is)
C
Apo B

Figure 9

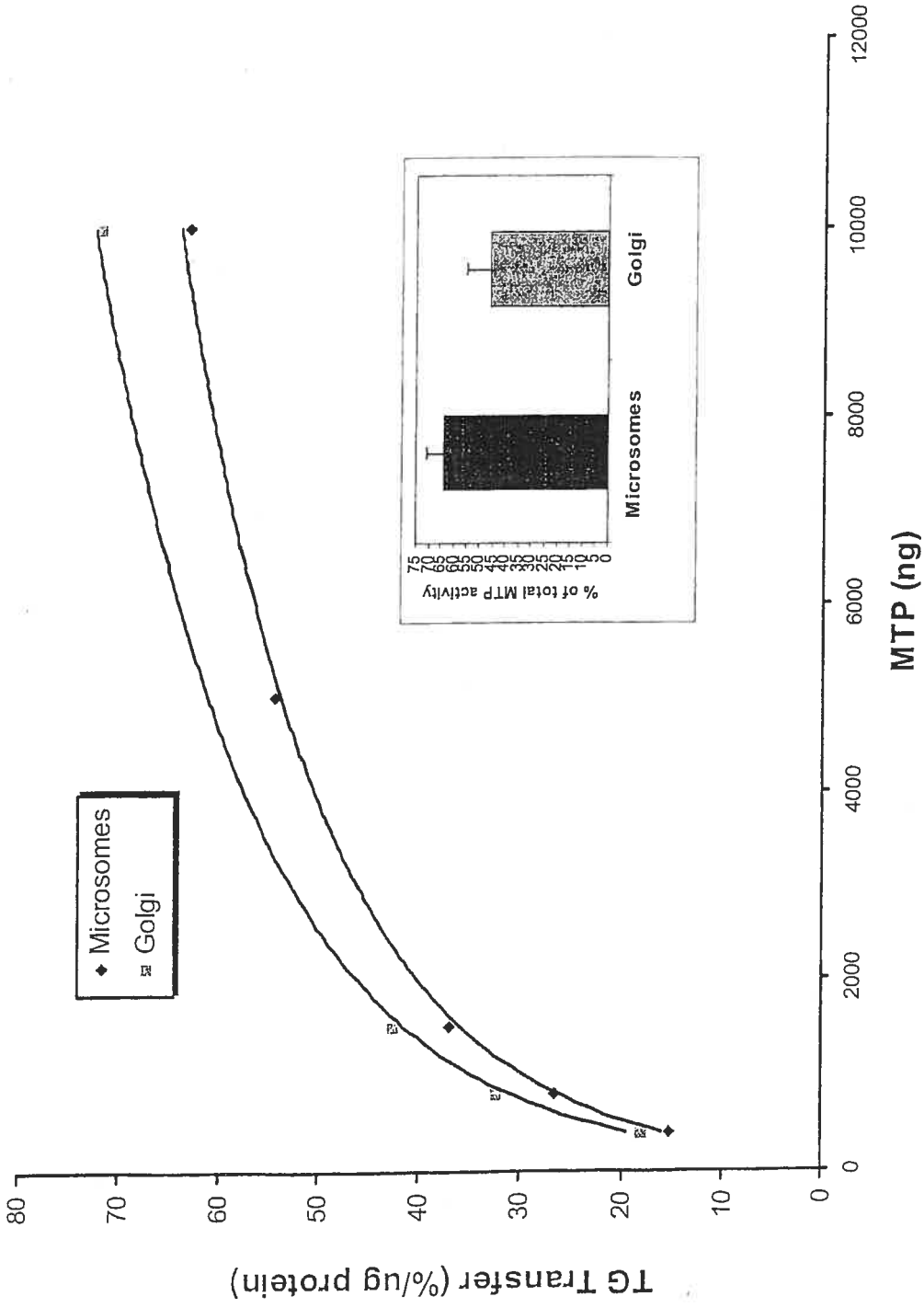

TG Transfer (%/ug protein)
MTP (ng)
Microsomes
Golgi
% of total MTP activity
Microsomes
Golgi

Figure 10

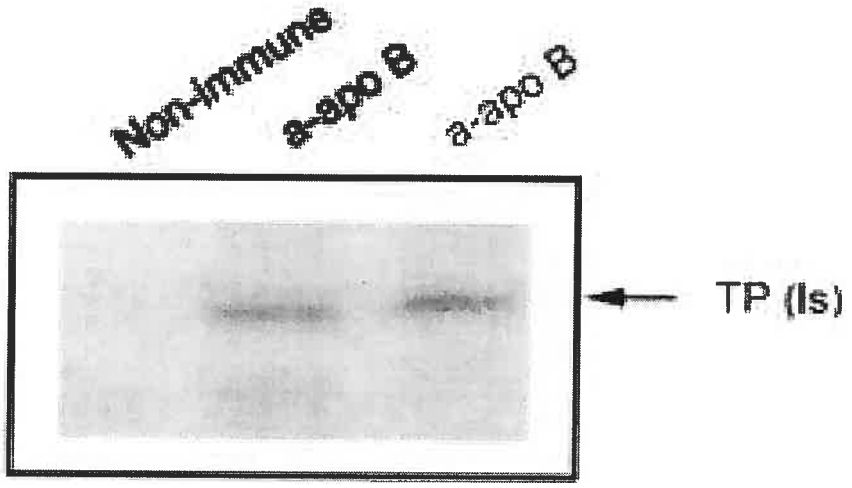
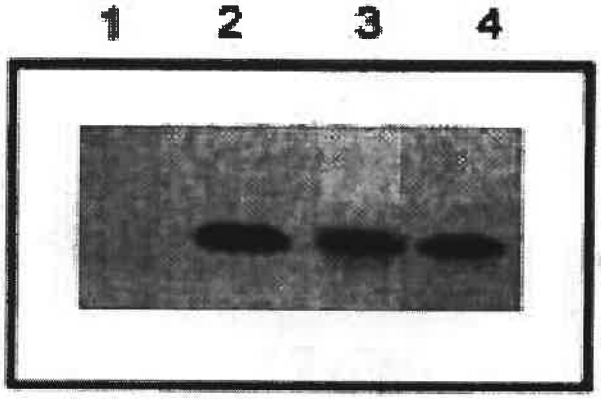


Figure 11



Apo B

Quatrième article:

INTESTINAL FATTY ACID BINDING PROTEIN AND MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN POLYMORPHISMS IN FRENCH-CANADIAN YOUTH

Dans le cadre de cette publication, j'ai mis au point les techniques servant à la détermination de ces deux polymorphismes, procédé au génotypage des 1742 sujets, conçu le plan d'analyse et effectué l'analyse statistique en collaboration avec le Dr Marie Lambert. Ma contribution à la rédaction de cette article a été majeure, mais il s'agit encore une fois du fruit d'une étroite collaboration avec le Dr Emile Lévy et Dr Marie Lambert.

Journal of Lipid Research, 2005, 46, 320-327

Intestinal fatty acid binding protein and microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms in French-Canadian youth

Simona Stan[1], Marie Lambert[2], Edgard Delvin[3], Gilles Paradis[4], Jennifer O'Loughlin[4], James A. Hanley[4], and Emile Levy[1*]

Departments of [1]Nutrition, [2]Pediatrics, and [3]Clinical Biochemistry, Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada; and [4]Department of Epidemiology and Biostatistics, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Abbreviated Title: I-FABP and MTP polymorphisms in youths

Address correspondence to: *Dr. Emile Levy
Centre de Recherche
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel.:(514) 345-4626
Fax:(514) 345-4999
E-mail [redacted]

ABSTRACT

Growing evidence suggests an association between lipid abnormalities and each of fatty acid binding protein (FABP), and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene variants. Our objectives were to determine whether the Ala54Thr FABP2 and G-493T MTP gene polymorphisms are associated with an increased risk of the insulin resistance syndrome (IRS) in youth and/or modify the expression of accompanying dyslipidemia. Our study of 1742 French-Canadians aged 9, 13 and 16 years did not provide evidence of a potential predisposition to IRS related to either FABP2 or MTP genotypes. However, we observed a heterogeneity of the FABP2 effect by IRS status on total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and apolipoprotein (apo) B concentrations (P for interaction = 0.045, 0.018, and 0.017, respectively). Among the metabolic components of IRS, only triglyceride (TG) displayed an interaction with FABP2 polymorphism: compared with Thr/Ala and Ala/Ala, the Thr/Thr genotype was associated with a steeper increase in TC, LDL-C and apo B parallel to TG concentrations ($P < 0.001$). IRS did not modify the associations between MTP polymorphism and any of the biochemical parameters. Our study suggests that the effects of FABP2 allelic variations on lipid traits are context dependent, indicating that this variant may play an important role in cardiovascular pathogenesis in the presence of IRS or hypertriglyceridemia.

Supplementary key words: Cholesterol, Apolipoprotein B, Insulin Resistance Syndrome, Children and Adolescents

ABBREVIATIONS

Apo, apolipoprotein;

BMI, body max index;

BP, blood pressure;

DNTP, deoxynucleoside triphosphate;

FABP, fatty acid binding protein;

HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol;

I-FABP, intestinal-FABP;

IFG, impaired fasting glucose;

IRS, insulin resistance syndrome;

LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol;

MTP, microsomal triglyceride transfer protein;

TC, total cholesterol;

TG, triglyceride;

INTRODUCTION

During the past few years, substantial progress has been made toward understanding intestinal fat absorption. It is now well recognized that the formation of triglyceride (TG)-rich lipoproteins within the enterocyte is a multi-step process that includes the uptake of lipolytic products and their translocation to the endoplasmic reticulum by fatty acid binding proteins (FABPs) for the re-esterification of lipids, the synthesis and posttranslational modification of various apolipoproteins and ultimately the assembly of chylomicrons (1, 2). Studies of genetic fat transport disorders have afforded new insight into the key functions of crucial intracellular proteins, such as apolipoprotein B (apo B) (3, 4), microsomal triglyceride transfer protein (MTP) (5) and Sar1 GTPase (6-8), the defects of which lead to hypobetalipoproteinemia, abetalipoproteinemia and chylomicron retention disease, respectively (9). Conversely, intestinal TG-rich lipoprotein overproduction contributes to the dyslipidemia associated with insulin resistance and diabetes (10-12). The abundant formation of TG-rich lipoproteins can be explained in part by a greater stability of intracellular apo B-48, enhanced intestinal enterocyte *de novo* lipogenesis, and upregulation of intestinal-FABP (I-FABP) and MTP. Moreover, some studies have shown that variations in gene coding for proteins involved in intestinal fat absorption might influence this process. In particular, the G-to-A substitution at codon 54 of the FABP2 gene, which results in an alanine-to threonine substitution at amino acid 54 (Ala54Thr) of I-FABP, has been reported to be associated with

increased intestinal fat absorption (13, 14), fatty acids (FA) oxidation (15), insulin resistance and diabetes(15). However, not all studies concur (16-18). In fact, the association between the FABP2 gene variants and lipid disorders appears to be much more complex than hypothesized since the same I-FABP mutation had no similar impact on the composition of plasma lipids, the basal metabolic rate or insulin, glucose and lipid levels in different populations (16). Therefore, this issue requires more careful investigation, the findings of which may contribute towards better understanding the specific role of I-FABP variants in exogenous fat transport and postprandial lipemic response. The current work also assessed the influence of the G-493T MTP gene polymorphism, which has also shown an impact on total cholesterol (TC), low-density lipoproteins-cholesterol (LDL-C), and LDL-apo B levels (20, 21).

Therefore, the present investigation was undertaken to examine whether the FABP2 and MTP gene variants are associated with an increased risk of the insulin resistance syndrome (IRS) or whether they modify the expression of the dyslipidemia associated with IRS in a pediatric French-Canadian population. The French-Canadian population, which is primarily and historically located in the province of Quebec, has the highest prevalence worldwide of lipoprotein lipase deficiency. It includes a large pool of individuals at risk for atherosclerosis and other lipid-related diseases (22, 23). These abnormalities are presumably related to a founder effect among the 8,000 ancestors of present-day French Canadians, who have had relatively little cross-breeding with individuals from other national origin groups (24).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Population Study

The design and methods of the 1999 Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey, a school-based survey of youth aged 9, 13 and 16 years, have been reported in detail (25, 26). A total of 2244 fasting plasma and DNA samples were available (25). We restricted this current analysis to 1742 children and adolescents of French-Canadian origin to reduce the confounding of genetic analyses by population stratification. The study was approved by the Ethics Review Board of Ste-Justine Hospital. Written informed consent was obtained from parents/guardians and written informed assent was obtained from study participants.

Anthropometry, Blood Pressure and Lipids

Height, weight, and blood pressure (BP) were measured according to standardized protocols (26). Body mass index (BMI) was computed as weight in kilograms divided by height in meters squared. Values of percentile cutoff points used to identify subjects with metabolic risk factors were estimated from the study distributions. Cutoff points were age and sex specific, and BP cutoff points were also height specific, according to the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents (27). Subjects with BMI $\geq 85^{th}$ percentile values were categorized as overweight. High TG, insulin and systolic BP were

defined as values ≥ 75th percentile, and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) was defined as values ≤ 25th percentile. Impaired fasting glucose (IFG) was defined as concentrations ≥ 6.1 and < 7.0 mmol/L. No study participant had fasting plasma glucose ≥ 7.0 mmol/L. There is no internationally accepted definition of childhood IRS; categorization of subjects as having IRS in our analyses required the presence of hyperinsulinemia and at least two of five risk factors: overweight, high systolic BP, high TG, low HDL-C and IFG. Current smokers were defined as those who responded positively to the question: "During the past 30 days, did you smoke cigarettes, even just a few puffs?" This question was not asked of 9-year-olds. Only 2.1% of this age responded positively to the question: "Have you ever smoked a whole cigarette?" Therefore, all 9-year-old individuals were classified as non smokers. Subjects who consumed alcohol regularly were defined as those who responded "about once a week" to: "During the last 12 months, how often did you drink alcohol?" (just to taste, less than once a month, about once a month, about once a week).

Biochemical Analyses

Blood samples were collected in the morning, after an overnight fast. Plasma TC, HDL-C, TG and glucose concentrations were determined on a Beckman Synchron Cx7 instrument (25, 26). Apos A-I and B were measured by nephelometry (Array Protein System, Beckman). The Friedewald equation was used to calculate LDL-C. Plasma insulin concentration was determined

with the ultrasensitive, Access® immunoassay system (Beckman Coulter, Inc), which has no cross-reactivity with proinsulin or C-peptide. Plasma FFA concentrations were quantified by an enzymatic colorimetric method (Wako chemicals).

Polymorphism Detection

Genomic DNA was prepared from white blood cells using the Puregene® DNA Isolation kit (Gentra Systems, Inc). A 228-bp DNA fragment containing the G-to-A substitution at codon 54 was amplified using the following primers: 5' CAC TTC CTA TGG GAT TTG ACT 3' and 5' TAC CCT GAG TTC AGT TCC GTC 3'. PCR was carried out in a 25 µl reaction volume containing 2 µmol/L of each primer, 200 µmol/L deoxynucleoside triphosphate (dNTP) Pharmacia)), 1 mmol/L $MgCl_2$, 2 units of Taq DNA polymerase (Gibco-BRL), 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 and 100 ng genomic DNA. After an initial 5 min denaturation at 95°C, amplifications were carried out for a total of 30 cycles: 94°C, 45 sec; 55°C, 60 sec; 72°C, 45 sec; and completed with a final 7 min extension at 72°C. To detect Ala54Thr polymorphism, PCR products were blotted on nylon membranes, hybridized at 43°C with digoxigenin-labelled probes corresponding to the Ala allele (5' GAA TCA AGC GCT TTT CGA A 3') and the Thr allele (5' GAA TCA AGC ACT TTT CGA A 3'), washed at 39°C and 42°C, respectively, and autoradiographed. For quality control purposes, genotyping of systematic random sample of 1 in 10 specimens was repeated using digestion of the

PCR products with Hha1 restriction enzyme (Gibco- BRL) to detect gene variants, as described by Baier *et al.* (15). For all samples, reading of the genotype was independently carried out by two individuals.

The DNA fragment used for the detection of the G-493T polymorphism by allele specific hybridization was obtained by PCR. The amplification was preceded by a denaturation at 94^0C for 5 minutes and performed for 30 cycles of 94^0C for 60 sec, 57^0C for 60 sec and 72^0C for 60 sec, in a buffer containing 2 µmol/L of each primer (5' AGT TTC ACA CAT AAG GAC AAT CAT CTA 3 and 5' GTA GTA AGG ATT CTC AAA CTC TGC 3'), 200 µmol/L dNTP, 0.8 mmol/L $MgCl_2$, 1.5 units of Taq DNA polymerase, 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 and 100 ng genomic DNA. The probes used for the allele specific hybridization were: MTP-G allele (5' TGA TTG GTG GTG GTA TGA A 3') and MTP-T allele (5' GTG ATT GGT TGT GGT ATG A 3'). The temperatures corresponding to the hybridization and the wash down of the wild (G) and mutated (T) probe were 44^0C, 45^0C, 44^0C, respectively. For quality control purposes, genotyping of systematic random sample of 1 in 10 specimens was repeated using a method adapted from Karpe *et al.*(28). A 109-bp DNA fragment was obtained by a polymerase chain reaction performed in 25 µl, containing 1 µmol/L of each primer (5' AGT TTC ACA CAT AAG GAC AAT CAT CTA 3' and 5' GGA TTT AAA TTT AAA CTG TTA ATT CAT ATC AC 3'), 200 µmol/L dNTP, 3.5 mmol/L $MgCl_2$, 2 units of Taq DNA polymerase, 67 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 and 100 ng of genomic DNA, under the following conditions: an initial denaturation at 95^0C for 5 min,

followed by 30 cycles: 94^{0}C for 30 sec, 57^{0}C for 60 sec, 72^{0}C for 2 min and a final elongation of 7 minutes at 72^{0}C. The 109-bp PCR product was digested with HphI – New England Biolabs (NEB); the anti-sense primer used for the PCR introduced a restriction site on the G allele only. For all samples reading of the genotype was independently carried out by two individuals.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with SAS statistical software (SAS Institute Inc.). For each gene locus examined, allele frequencies were estimated by the gene-counting method (29). A Chi-square ($\chi 2$) test was used to determine whether genotypes at each gene locus were in Hardy-Weinberg equilibrium. Subjects were categorized according to their IRS status (yes/no). Between-group allele and genotype frequency distributions were compared by a Chi-square ($\chi 2$) test. To take the design effect into account, mixed models were used for all analyses of variance and regressions, with genetic markers and other independent variables treated as fixed effects and with clustering between subjects in the same school treated as a random effect. We used mixed logistic regression to examine the association between IRS status and the FABP2 and MTP genotypes. We used mixed ANOVA and mixed linear regression to study the associations between genotypes and metabolic variables. Scheffe's contrasts were used for post-hoc pair comparisons. Insulin, TG, FFA and BMI values were $\log_e$-transformed for statistical analyses to improve the normality of their

distributions. Because we pooled age and sex groups, age- and sex-specific Z-scores for BMI, insulin, glucose, TG and HDL-C were used in linear regression analyses. To standardize a value (i.e., compute its Z score), we substracted the mean of the corresponding study distribution and divided by the SD.

RESULTS

The clinical and biochemical characteristics of participants are shown in Table 1. The prevalence of IRS was 11.25%. As expected, youth with IRS displayed significantly higher BMI, systolic and diastolic BP, TC, LDL-C, apo B, TG, FFA, insulin and glucose, as well as lower levels of HDL-C and apo A-I than youth without IRS. No differences were detected in age, sex, cigarette smoking and alcohol intake between the two groups.

All 1742 individuals were genotyped for the Ala54Thr polymorphism in the FABP2 gene and the G-493T polymorphism in the MTP gene. At both loci, the distribution of genotypes was not significantly different from that expected under the Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.384$ and 0.198 respectively). There were no significant differences in FABP2 and MTP allele or genotype frequencies between subjects with and without IRS (Table 2). Similarly, there were no significant associations between FABP2 variants and IRS or between MTP variants and IRS (Table 3).

We examined the effect of FABP2 polymorphism on mean lipid, apolipoproteins (A-I, B), FFA, glucose and insulin levels. Because we did not

detect heterogeneity of effect of FABP2 polymorphism by sex or age [with the exception of insulin (for which the *P*-value for the interaction FABP2 x sex = 0.014), all interactions *P*-values were >0.1)], sex and age groups were pooled in subsequent analyses. We observed a heterogeneity of FABP2 effect by IRS status on TC, LDL-C, TG and insulin (*P* for interaction = 0.045, 0.018, 0.017 and 0.044, respectively). Therefore, subsequent analyses were conducted for each IRS subgroup separately (IRS– and IRS+). Mean concentrations of TC and LDL-C were lowest in IRS+ subjects with the FABP2 Ala/Ala genotype (Table 4; *P* for comparisons between Ala/Ala and Thr/Thr genotypes = 0.040 and 0.020 for TC and LDL-C, respectively). Although not statistically significance, a similar trend was observed for apo B. Mean concentrations of HDL-C, apo A-I, TG, FFA, glucose and insulin were similar among IRS+ subjects with different FABP2 genotypes. In IRS– subjects, the mean apo A-I concentrations tended to be higher in Ala/Thr heterozygotes than in Ala/Ala or Thr/Thr homozygotes (p = 0.098 and 0.065, respectively); mean concentrations of all other biochemical variables were similar among IRS- subjects with different FABP2 genotypes.

Because IRS was defined as hyperinsulinemia in combination with two other more of variables (overweight, high systolic BP, IFG, high TG and low HDL-C), we tested whether specific metabolic components of IRS could explain the heterogeneity of FABP2 effect by IRS status on TC, LDL-C and apo B. We did not detect significant interactions between FABP2 polymorphism, and BMI, insulin, glucose and HDL-C on mean levels of TC,

LDL-C and apo B (all $P > 0.1$). However, there was heterogeneity of FABP2 effect by plasma TG concentrations. Table 5 shows regression coefficients for main effects and for interaction terms between Z scores for TG concentration and FABP2 genotype in determining TC, LDL-C and apo B levels. Regression coefficients for the interaction effect in the Thr/Thr individuals were statistically significant for the three dependent variables, compared with Ala/Ala subjects. Figure 1 depicts effect modification of the associations between TG, and TC, LDL-C and apo B by FABP2 genotype. The slopes of the regression lines for the Thr/Thr homozygotes were statistically significantly different from those for the Ala/Thr heterozygotes ($P < 0.001$ for TC, LDL-C and apo B) and from those for the Ala/Ala homozygotes ($P < 0.001$ for TC, LDL-C and apo B), whereas the slopes of the regression lines were similar for Ala/Thr heterozygotes and Ala/Ala homozygotes ($p = 0.588$, 0.737 and 0.554 for TC, LDL-C and apo B, respectively). Similarly, the associations between FABP2 genotype, and TC, LDL-C and apo B were modified by plasma TG concentrations. As shown in Fig 2, the Thr/Thr genotype was associated with a trend toward lower values for TC, LDL-C and apo B compared to Ala/Thr or Ala/Ala genotypes, in subjects with lower TG levels (age and sex-specific Z score for TG < -1). Conversely, the Thr/Thr genotype was associated with a significant increase in TC ($P = 0.005$ and 0.006, respectively), LDL-C ($P = 0.009$ and 0.008, respectively) and apo B ($P = 0.004$ and 0.005, respectively) compared to

Ala/Thr or Ala/Ala genotypes, in subjects with higher TG levels (age and sex-specific Z score for TG ≥ 1).

Finally, we studied the effect of MTP polymorphism on mean lipid, apolipoproteins, FFA, glucose and insulin levels. We did not detect heterogeneity of MTP effect by sex, age or IRS status (all $p > 0.05$). Therefore, all subjects were pooled for subsequent analyses. Mean concentrations of TC, LDL-C, apo B, HDL-C, apo A-I, TG, FFA, glucose and insulin were similar among subjects with different MTP genotypes (Table 6).

DISCUSSION

An important new finding of this study is the demonstration of an interaction between FABP2 gene variants and IRS status in determining fasting plasma TC, LDL-C and apo B concentrations. Moreover, among the metabolic components of IRS, only TG level displayed an interaction with the FABP2 polymorphism, which was stronger than the interaction between FABP2 and IRS. This result suggests that TG concentration is the metabolic component responsible for the heterogeneity of FABP2 effect by IRS status on TC, LDL-C and apo B.

The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene could alter the functional properties of I-FABP, a protein expressed only in the absorptive enterocytes of small intestinal villi. The increased affinity of Thr-containing I-FABP for FA modifies intestinal fat absorption (14), postprandial lipid metabolism (13) and dyslipidemia (17, 30). Although several investigations

have reported an association between the Ala54Thr polymorphism and insulin sensitivity in humans (19, 31, 32), others have not demonstrated the influence of FABP2 gene variants on insulin levels and insulin resistance (16-18). Our data revealed no significant association between FABP2 polymorphism and fasting insulin. However, our study is among the few investigations conducted in a pediatric population. Because intracellular accumulation of TG in insulin-responsive tissues such as muscle and liver leads to insulin resistance (33), it is possible that the effect of the FABP2 polymorphism on fasting insulin or insulin resistance is modified by age. Longer exposure to the enhanced intestinal fat absorption associated with the Thr/Thr variant could lead to greater accumulation of TG in insulin-responsive tissues with age and a greater effect on insulin sensitivity. Further studies are required to clarify these hypotheses, especially because targeted gene disruption of FABP2 in mice did not compromise dietary fat absorption in vivo but was associated with the development of insulin resistance (34). It remains possible that other FABPs or lipid carriers are capable of compensating for the deficient function assumed by the disrupted gene (35, 36).

The FABP2 Thr/Thr genotype was associated with a much steeper increase in TC, LDL-C and apo B in parallel to TG concentrations than the Thr/Ala and Ala/Ala genotypes. As demonstrated in Fig 1, the interaction between FABP2 and TG clearly suggested a recessive effect, because no gene-dose response was found: the regression slopes for the associations

between TG and TC, LDL-C and apo B were similar for Ala/Thr heterozygotes and Ala/Ala homozygotes.

As a consequence of the significant interaction between FABP2 genotype and TG concentrations, the Thr/Thr genotype is associated with a decrease in mean TC, LDL-C and apo B concentrations compared with Thr/Ala or Ala/Ala genotypes in subjects with lower TG concentrations and with an increase in mean TC, LDL-C and apo B in individuals with higher TG concentrations. This gene-lipid interaction and the low prevalence of the Thr/Thr homozygotes could explain some of the discrepancies between studies, which reported variable effects of FABP2 genotype on lipids (17, 30, 37).

The mechanism explaining the association between the FABP2 Thr/Thr variant and a steeper increase in fasting TC, LDL-C and apo B in conjunction with TG, is unknown. In vitro experiments using Caco-2 cells that were modified genetically (38) and studies with human intestinal explants (14) demonstrated the efficiency of FABP2 Thr/Thr variant to enhance intestinal fat absorption compared with the Ala/Ala variant. We speculate that high levels of postprandial FFA transported by chylomicrons and chylomicron remnants could result in increased hepatic synthesis of VLDLs that are, in turn, catabolized to LDL particles. This is consistent with the greater postprandial TG response in Finns with elevated circulating VLDLs (13) as well as with high plasma cholesterol concentrations accompanied by reduced excretion of fecal bile acids (39).

The Thr-encoding allele has been shown to be associated with a variety of phenotypes. According to our data, the effects of allelic variations of FABP2 on lipid traits are context dependent. Recently, Damcott et al. (40) reported that genetic variation in FABP2 promoters affects transcriptional activity and leads to alterations in body composition and lipid processing in Hispanic and non-Hispanic subgroups in the San Luis Valley Diabetes Study. Differences in transcriptional activity have been suggested to result from the FABP2p-ID haplotype. More recently, Formanack and Baier (41) have shown that genotypes of variations in the FABP2 promoter in Pima Indians were in complete concordance with Ala54Thr. As stated by these investigators, in vivo phenotypic associations previously attributed to the Ala54Thr substitution could instead be attributable to the variant promoter carried on the same allele. Therefore, it would be interesting to perform sequences analyses to establish whether French-Canadian children with homozygous Thr/Thr or Ala/Ala genotypes have the FABP2p-ID or the variant promoter described by the aforementioned investigators (40, 41).

An association has been reported between G-493T polymorphism in the promoter of the MTP gene, on the one hand, and either a reduction in TC, LDL-C and apo B or an increase in BMI, plasma insulin levels and the secretion of TG-rich lipoproteins, on the other hand (42-44). In contrast, the G-493T polymorphism was associated with increased levels of TC, LDL-C, TG and apo B in young African-American men from the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study (21), whereas no association between

the G-493T polymorphism and lipid phenotype could be demonstrated in the Framingham Offspring Study cohort (45). In the present study, the G-493 T polymorphism in the MTP gene promoter was not associated with IRS or with variations in lipid, lipoprotein or glucose traits in French-Canadian youth. The relationship between insulin resistance and MTP gene variants warrants further investigation, given that the promoter region of the MTP gene contains a negative insulin response element and that insulin, acting through its receptor, can decrease MTP expression (46, 47).

Although we could not detect a relationship between FABP2 gene variants, the G-493T polymorphism, and IRS in our large sample of French-Canadian youth, our data indicate an interaction between FABP2 polymorphism and IRS status in determining plasma concentrations of TC, LDL-C and apo B. In particular, among the numerous metabolic components, TG displayed a robust association with FABP2 polymorphism. Because these multiple clinical phenotypes strongly increase the risk for cardiovascular disease, special attention should be assigned to uncovering FABP2 Thr variants in IRS in French-Canadian children and adolescents. Furthermore, these adverse outcomes should be examined in youth from different origins and call for the development of long-term follow-up. Finally, the precise mechanisms underlying the impact of FABP2 polymorphism on lipid abnormalities in IRS deserve additional studies.

AKNOWLEDGEMENTS

SS was the recipient of a Doctoral Research Award of the Canadian Institutes of Health Research. The survey was funded by the Quebec Ministry of Health and Social Services and by Health Canada. The study on insulin and cardiovascular risk factors in youth is funded by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-44027 and MOP-10584). JOL is the Canada Research Chair in the Childhood Determinants of Adult Chronic Disease. The authors thank Mrs. Schohraya Spahis for her expert secretarial assistance.

Table 1. Characteristics of study participants according to IRS status

	Total	IRS [a]		
		No	Yes	*P* [b]
	(n= 1742)	(n = 1546)	(n = 196)	
Age: 9-year-olds, % (n)	31.9 (555)	32.4(501)	27.6 (54)	0.387
13-year-olds, % (n)	31.0 (540)	30.8(476)	32.7 (64)	
16-year-olds, % (n)	37.1 (647)	36.8(569)	39.8 (78)	
Sex: male, % (n)	50.3 (876)	50.5(780)	49.0 (96)	0.698
Smoking (yes), % (n)	19.6 (342)	19.7(304)	19.4 (38)	0.927
Alcohol intake (yes), % (n)	8.7 (152)	9.2 (142)	5.1 (10)	0.561
BMI [c] (kg/m^2)	20.2 ± 4.4	19.4 ± 3.5	26.4 ± 5.6	**<0.001**
Systolic BP (mmHg)	111.8 ± 13.7	110.5±13.0	121.9±15.0	**<0.001**
Diastolic BP (mmHg)	59.3 ± 7.1	58.8 ± 6.9	63.4 ± 7.4	**<0.001**
TC (mmol/L)	3.99 ± 0.75	3.97 ± 0.75	4.16 ± 0.80	**0.001**
LDL-C (mmol/L)	2.30 ± 0.64	2.28 ± 0.63	2.46 ± 0.68	**< 0.001**
ApoB (g/L)	0.66 ± 0.18	0.65 ± 0.17	0.74 ± 0.19	**< 0.001**
HDL-C (mmol/L)	1.30 ± 0.25	1.32 ± 0.25	1.10 ± 0.19	**< 0.001**
ApoA1 (g/L)	1.19 ± 0.17	1.20 ± 0.17	1.11 ± 0.16	**< 0.001**
TG [c] (mmol/L)	0.86 ± 0.42	0.81 ± 0.34	1.32 ± 0.65	**< 0.001**
FFA [c] (mmol/L)	0.44 ± 0.21	0.43 ± 0.21	0.45 ± 0.19	**0.050**
Glucose (mmol/L)	5.16 ± 0.38	5.14 ± 0.37	5.33 ± 0.41	**< 0.001**
Insulin [c] (pmol/L)	43.5 ± 30.1	37.5 ± 18.0	90.6 ± 55.1	**< 0.001**

Data are expressed as percentage (frequency) or mean (SD). Apo B, apolipoprotein B; BMI, body mass index; BP, blood pressure; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; IRS, insulin resistance syndrome; LDL-C, low density lipoprotein-cholesteol; TC, total cholesterol; TG, triglyceride

[a], IRS is defined as the presence hyperinsulinemia (≥ 75th percentile) in combination with two or more of: overweight (BMI ≥ 85th percentile), high TG (≥ 75th percentile), low HDL-C (≤ 25th percentile), high systolic BP (≥ 75th percentile) and high glucose (≥ 6.1 mmol/L).

[b], *P*-value for comparisons between groups (IRS- and IRS+).

[c], Untransformed data are presented in the table; log_e-transformed values were used for statistical comparisons.

Table 2. Association between IRS and FABP2 and MTP genotypes: *distribution of FABP2 and MTP alleles and genotypes according to IRS status*

	IRS-	IRS+	*P* [a]
FABP2 allele, % (n)			
Ala	73.9 (2284)	75.8 (297)	0.419
Thr	26.1 (808)	24.2 (95)	
FABP2 genotype, % (n)			
Ala/Ala	55.1 (851)	57.1 (112)	0.654
Ala/Thr	37.6 (582)	37.2 (73)	
Thr/Thr	7.3 (113)	5.6 (11)	
MTP allele, % (n)			
G	73.6 (2275)	74.7 (293)	0.621
T	26.4 (817)	25.3 (99)	
MTP genotype, % (n)			
G/G	53.8 (831)	53.6 (105)	0.357
G/T	39.7 (613)	42.4 (83)	
T/T	6.6 (102)	4.1 (8)	

IRS- indicates subjects who did not meet diagnostic criteria for IRS; IRS+ indicates subjects who met criteria for IRS. FAPB, fatty acid binding protein; MTP, microsomal triglyceride transfer protein.
[a], *P* value for comparisons between groups (IRS- and IRS+).

Table 3: Association between IRS and FABP2 and MTP genotypes: *adjusted odds ratios for the presence of IRS according to FABP2 and MTP genotypes*

Variable	Odds ratio	*P* [b]
FABP2 genotype		
Ala/Ala (n = 963)	1.00	
Ala/Thr (n = 655)	0.98	0.871
Thr/Thr (n = 124)	0.73	0.326
MTP genotype		
G/G (n = 936)	1.00	
G/T (n = 696)	1.05	0.731
T/T (n = 110)	0.57	0.126

Odds ratios are shown for the presence of IRS in subjects with FABP2 Ala/Thr and Thr/Thr genotypes compared to subjects with FABP2 Ala/Ala genotype and in subjects with MTP G/T and T/T genotypes compared to subjects with MTP G/G genotype. Models were adjusted for age, sex, cigarette use, and alcohol intake.

Table 4. Biochemical characteristics of study participants by IRS status and FABP2 genotype

	IRS –				IRS +			
	FABP2 genotype			P^a	FABP2 genotype			P^a
	Ala/Ala (n = 851)	Ala/Thr (n = 582)	Thr/Thr (n = 113)		Ala/Ala (n = 112)	Ala/Thr (n = 73)	Thr/Thr (n = 11)	
TC (mmol/L)	3.96 ± 0.76	3.98 ± 0.70	3.98 ± 0.86	0.816	4.07 ± 0.71	4.21 ± 0.90	4.69 ± 0.68	**0.026**
LDL-C (mmo/L)	2.28 ± 0.65	2.27 ± 0.59	2.35 ± 0.75	0.303	2.35 ± 0.58	2.55 ± 0.80	2.92 ± 0.48	**0.006**
ApoB (g/L)	0.65 ± 0.17	0.65 ± 0.16	0.67 ± 0.22	0.150	0.73 ± 0.18	0.74 ± 0.19	0.85 ± 0.18	0.107
HDL-C (mmol/L)	1.32 ± 0.25	1.34 ± 0.25	1.27 ± 0.21	0.066	1.09 ± .017	1.12 ± 0.20	1.10 ± 0.23	0.426
ApoA1 (g/L)	1.19 ± 0.17	1.22 ± 0.18	1.17 ± 0.15	**0.021**	1.11 ± 0.16	1.10 ± 0.16	1.11 ± 0.16	0.889
TG (mmol/L)[b]	0.80 ± 0.33	0.82 ± 0.36	0.81 ± 0.32	0.630	1.40 ± 0.70	1.18 ± 0.48	1.47 ± 0.96	0.123
FFA (mmol/L)[b]	0.43 ± 0.21	0.44 ± 0.21	0.42 ± 0.21	0.977	0.46 ± 0.19	0.42 ± 0.17	0.52 ± 0.25	0.085
Glucose (mmol/L)	5.14 ± 0.38	5.14 ± 0.36	5.18 ± 0.39	0.547	5.33 ± 0.41	5.33 ± 0.41	5.33 ± 0.38	0.775
Insulin (pmol/L)[b]	37.0 ± 17.3	38.1 ± 18.3	38.8 ± 21.0	0.360	97.7 ± 66.6	80.8 ± 33.3	83.2 ± 25.6	0.097

Data are expressed as means ± SD.[a],
P value for comparisons between genotypes after adjustment for school, age, sex, cigarette use and alcohol intake.
[b], Untransformed data are presented; $\log_e$-transformed values were used for formal statistical comparisons.

Table 5. Multiple mixed regression analysis showing the interaction of FABP2 genotype with the effect of TG concentrations on TC, LDL-C and apo B concentrations

Explanatory Variable	Dependent Variable					
	TC (mmol/L)		LDL-C (mmol/L)		Apo B (g/L)	
	β (SE)	*P*	β (SE)	*P*	β (SE)	*P*
Z-score for TG (1 SD)	0.362 (0.020)	**< 0.001**	0.180 (0.020)	**< 0.001**	0.082 (0.005)	**< 0.001**
FABP2 genotype:						
Thr/Thr	0.119 (0.054)	**0.029**	0.124 (0.054)	**0.021**	0.034 (0.013)	**0.012**
Ala/Thr	-0.010 (0.029)	0.735	-0.006 (0.029)	0.833	-0.004 (0.007)	0.590
Interaction term:						
Z-score for TG x Thr/Thr	0.250 (0.058)	**< 0.001**	0.240 (0.057)	**< 0.001**	0.059 (0.014)	**< 0.001**
Z-score for TG x Ala/Thr	-0.015 (0.029)	0.610	-0.009 (0.029)	0.762	-0.004 (0.007)	0.542

Table 6 **Biochemical characteristics of study participants by MTP genotype**

	MTP genotype			*P* [a]
	G/G (n=936)	G/T (n=696)	G/T (n=110)	
TC (mmol/L)	3.99 ± 0.77	4.00 ± 0.75	3.98 ± 0.70	0.983
LDL-C (mmol/L)	2.31 ± 0.65	2.30 ± 0.64	2.31 ± 0.61	0.944
ApoB (g/L)	0.66 ± 0.18	0.66 ± 0.17	0.66 ± 0.18	0.981
HDL-C (mmol/L)	1.29 ± 0.25	1.30 ± 0.30	1.30 ± 0.24	0.805
ApoA1 (g/L)	1.19 ± 0.17	1.19 ± 0.18	1.19 ± 0.17	0.972
TG (mmol/L) [b]	0.86 ± 0.40	0.87 ± 0.46	0.83 ± 0.36	0.684
FFA (mmol/L) [b]	0.43 ± 0.21	0.43 ± 0.21	0.46 ± 0.22	0.300
Glucose (mmol/L)	5.16 ± 0.38	5.17 ± 0.38	5.17 ± 0.36	0.801
Insulin (pmol/L) [b]	43.6 ± 29.2	43.9 ± 32.6	40.0 ± 19.3	0.452

Data are expressed as mean ± SD.
[a] *P* value for comparisons between genotypes after adjustment for school, age, sex, cigarette use and alcohol intake.
[b], Untransformed data are presented; $\log_e$ transformed values were used for formal statistical comparisons.

LEGENDS

Figure 1: Mean total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and apolipoprotein B levels by triglyceride (TG) concentration and fatty acid binding protein-2 (FABP2) genotype. Z scores for TG concentration were estimated from the study distribution. Means were adjusted for school, age, sex, cigarette use, alcohol intake, apo E genotype, and Z scores for body mass index (BMI), insulin and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C).

Figure 2: Mean TC, LDL-C and apo B levels by FABP2 genotype and TG concentration. TG categories were defined as follows: Z score for TG < -1, Z score for TG ≥ -1 and < 0, Z score for TG ≥ 0 and < 1, and Z score for TG ≥ 1. For the Ala/Ala genotype, the numbers of subjects within each TG category were 148, 373, 296, and 146 from the lowest (Z score for TG < -1) to the highest (Z score for TG ≥ 1) TG categories respectively. For the Ala/Thr and Thr/Thr genotypes, the corresponding subjects numbers were 100, 243, 213, 99 and 20, 40, 50, 14, respectively. Means were adjusted for school, age, sex, cigarette use, alcohol intake, apo E genotype, and Z scores for BMI, insulin and HDL-C.

REFERENCES

1. Davidson, N. O., and G. S. Shelness. 2000. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu.Rev.Nutr* **20**: 169-193.
2. Levy, E., and D. Menard. 2000. Developmental aspects of lipid and lipoprotein synthesis and secretion in human gut. *Microsc.Res.Tech.* **49**: 363-373.
3. Burnett, J. R., J. Shan, B. A. Miskie, A. J. Whitfield, J. Yuan, K. Tran, C. J. McKnight, R. A. Hegele, and Z. Yao. 2003. A novel nontruncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia. *J Biol.Chem.* **278**: 13442-13452.
4. Levy, E., C. C. Roy, L. Thibault, A. Bonin, P. Brochu, and E. G. Seidman. 1994. Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy. *J Lipid Res.* **35**:2170-2177.
5. Wetterau, J. R., L. P. Aggerbeck, M. E. Bouma, C. Eisenberg, A. Munck, M. Hermier, J. Schmitz, G. Gay, D. J. Rader, and R. E. Gregg. 1992. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* **258**: 999-1001.
6. Levy, E., Y. Marcel, R. J. Deckelbaum, R. Milne, G. Lepage, E. Seidman, M. Bendayan, and C. C. Roy. 1987. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* **28**: 1263-1274.

7. Jones, B., E. L. Jones, S. A. Bonney, H. N. Patel, A. R. Mensenkamp, S. Eichenbaum-Voline, M. Rudling, U. Myrdal, G. Annesi, S. Naik, N. Meadows, A. Quattrone, S. A. Islam, R. P. Naoumova, B. Angelin, R. Infante, E. Levy, C. C. Roy, P. S. Freemont, J. Scott, and C. C. Shoulders. 2003. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat.Genet.* **34**: 29-31.

8. Siddiqi, S. A., F. S. Gorelick, J. T. Mahan, and C. M. Mansbach. 2003. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci.* **116**: 415-427.

9. Levy, E. 1996. The genetic basis of primary disorders of intestinal fat transport. *Clin.Invest Med.* 19: 317-324.

10. Haidari, M., N. Leung, F. Mahbub, K. D. Uffelman, R. Kohen-Avramoglu, G. F. Lewis, and K. Adeli. 2002. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol.Chem.* **277**: 31646-31655.

11. Parks, E. J. 2001. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr.Atheroscler.Rep.* **3**: 462-470.

12. Zoltowska, M., E. Ziv, E. Delvin, D. Sinnett, R. Kalman, C. Garofalo, E. Seidman, and E. Levy. 2003. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in *Psammomys obesus*: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* **52**: 2539-2545.

13. Agren, J. J., R. Valve, H. Vidgren, M. Laakso, and M. Uusitupa. 1998. Postprandial lipemic response is modified by the polymorphism at codon 54 of the fatty acid-binding protein 2 gene. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18**: 1606-1610.

14. Levy, E., D. Menard, E. Delvin, S. Stan, G. Mitchell, M. Lambert, E. Ziv, J. C. Feoli-Fonseca, and E. Seidman. 2001. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol.Chem.* **276**: 39679-39684.

15. Baier, L. J., J. C. Sacchettini, W. C. Knowler, J. Eads, G. Paolisso, P. A. Tataranni, H. Mochizuki, P. H. Bennett, C. Bogardus, and M. Prochazka. 1995. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin.Invest* **95**: 1281-1287.

16. Galluzzi, J. R., L. A. Cupples, J. B. Meigs, P. W. Wilson, E. J. Schaefer, and J. M. Ordovas. 2001. Association of the Ala54-Thr polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein with 2-h postchallenge insulin levels in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* **24**: 1161-1166.

17. Pihlajamaki, J., J. Rissanen, S. Heikkinen, L. Karjalainen, and M. Laakso. 1997. Codon 54 polymorphism of the human intestinal fatty acid binding protein 2 gene is associated with dyslipidemias but not with insulin resistance in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17**: 1039-1044.

18. Sipilainen, R., M. Uusitupa, S. Heikkinen, A. Rissanen, and M. Laakso. 1997. Variants in the human intestinal fatty acid binding protein 2 gene in obese subjects. *J Clin.Endocrinol.Metab* **82**: 2629-2632.

19. Chiu, K. C., L. M. Chuang, A. Chu, and C. Yoon. 2001. Fatty acid binding protein 2 and insulin resistance. *Eur J Clin.Invest* **31**: 521-527.

20. Ledmyr, H., F. Karpe, B. Lundahl, M. McKinnon, C. Skoglund-Andersson, and E. Ehrenborg. 2002. Variants of the microsomal triglyceride transfer protein gene are associated with plasma cholesterol levels and body mass index. *J Lipid Res.* **43**: 51-58.

21. Juo, S. H., Z. Han, J. D. Smith, L. Colangelo, and K. Liu. 2000. Common polymorphism in promoter of microsomal triglyceride transfer protein gene influences cholesterol, ApoB, and triglyceride levels in young african american men: results from the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20**: 1316-1322.

22. Ma, Y., H. E. Henderson, V. Murthy, G. Roederer, M. V. Monsalve, L. A. Clarke, T. Normand, P. Julien, C. Gagne, and M. Lambert, 1991. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N.Engl.J Med.* **324**: 1761-1766.

23. Leitersdorf, E., E. J. Tobin, J. Davignon, and H. H. Hobbs. 1990. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin.Invest* **85**: 1014-1023.

24. De Braekeleer, M., C. Dionne, C. Gagne, P. Julien, D. Brun, M. R. Ven Murthy, and P. J. Lupien. 1991. Founder effect in familial hyperchylomicronemia among French Canadians of Quebec. *Hum.Hered.* **41**: 168-173.

25. Allard, P., E. E. Delvin, G. Paradis, J. A. Hanley, J. O'Loughlin, C. Lavallee, E. Levy, and M. Lambert. 2003. Distribution of fasting plasma insulin, free fatty acids, and glucose concentrations and of homeostasis model assessment of insulin resistance in a representative sample of Quebec children and adolescents. *Clin.Chem.* **49**: 644-649.

26. Paradis, G., M. Lambert, J. O'Loughlin, C. Lavallee, J. Aubin, P. Berthiaume, M. Ledoux, E. E. Delvin, E. Levy, and J. A. Hanley. 2003. The Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey: design and methods of a cardiovascular risk factor survey for youth. *Can.J Cardiol.* **19**: 523-531.

27. National High Blood Pressure Education Program Working Group on Blood Pressure in Children and Adolescents. 2004. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* **114**:555-576.

28. Karpe, F., B. Lundahl, E. Ehrenborg, P. Eriksson, and A. Hamsten. 1998. A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18**: 756-761.

29. Yasuda, N. and M. Kimura. 1968. A gene-counting method of maximum likelihood for estimating gene frequencies in ABO and ABO-like systems. *Ann.Hum Genet* **31**: 409-420.

30. Galluzzi, J. R., L. A. Cupples, J. D. Otvos, P. W. Wilson, E. J. Schaefer, and J. M. Ordovas. 2001. Association of the A/T54 polymorphism in the intestinal fatty acid binding protein with variations in plasma lipids in the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* **159**: 417-424.

31. Mitchell, B. D., C. M. Kammerer, P. O'Connell, C. R. Harrison, M. Manire, P. Shipman, M. P. Moyer, M. P. Stern, and M. L. Frazier. 1995. Evidence for linkage of postchallenge insulin levels with intestinal fatty acid-binding protein (FABP2) in Mexican-Americans. *Diabetes* **44**: 1046-1053.

32. Yamada, K., X. Yuan, S. Ishiyama, K. Koyama, F. Ichikawa, A. Koyanagi, W. Koyama, and K. Nonaka. 1997. Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. *Diabetologia* **40**: 706-710.

33. Lewis, G. F., A. Carpentier, K. Adeli, and A. Giacca. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr.Rev.* **23**: 201-229.

34. Vassileva, G., L. Huwyler, K. Poirier, L. B. Agellon, and M. J. Toth. 2000. The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J* **14**: 2040-2046.

35. Agellon, L. B., M. J. Toth, and A. B. Thomson. 2002. Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol.Cell Biochem.* **239**: 79-82.

36. Shen, H., P. Howles, and P. Tso. 2001. From interaction of lipidic vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **50 Suppl 1**: S103-S125.

37. Campagna, F., A. Montali, M. G. Baroni, A. T. Maria, G. Ricci, R. Antonini, R. Verna, and M. Arca. 2002. Common variants in the lipoprotein lipase gene, but not those in the insulin receptor substrate-1, the beta3-adrenergic receptor, and the intestinal fatty acid binding protein-2 genes, influence the lipid phenotypic expression in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* **51**: 1298-1305.

38. Baier, L. J., C. Bogardus, and J. C. Sacchettini. 1996. A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells. *J Biol.Chem.* **271**: 10892-10896.

39. Hegele, R. A., T. M. Wolever, J. A. Story, P. W. Connelly, and D. J. Jenkins. 1997. Intestinal fatty acid-binding protein variation associated with variation in the response of plasma lipoproteins to dietary fibre. *Eur J Clin.Invest* **27**: 857-862.

40. Damcott, C. M., E. Feingold, S. P. Moffet, M. M. Barmada, J. A. Marshall, R. F. Hamman, and R. E. Ferrell. 2003. Variation in the FABP2 promoter alters transcriptional activity and is associated with body composition and plasma lipid levels. *Hum. Genet.* **112**:610-616.

41. Formanack, M. L., and L. J. Baier. 2004. Variation in the FABP2 promoter affects gene expression: implications for prior association studies. *Diabetologia.* **47**:349-351.

42. Gordon, D. A. and H. Jamil. 2000. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim.Biophys.Acta* **1486**: 72-83.

43. Chen, S. P., K. C. Tan, and K. S. Lam. 2003. Effect of the microsomal triglyceride transfer protein -493 G/T polymorphism and type 2 diabetes mellitus on LDL subfractions. *Atherosclerosis* **167**: 287-292.

44. Ledmyr, H., F. Karpe, B. Lundahl, M. McKinnon, C. Skoglund-Andersson, and E. Ehrenborg. 2002. Variants of the microsomal triglyceride transfer protein gene are associated with plasma cholesterol levels and body mass index. *J Lipid Res.* **43**: 51-58.

45. Couture, P., J. D. Otvos, L. A. Cupples, P. W. Wilson, E. J. Schaefer, and J. M. Ordovas. 2000. Absence of association between genetic variation in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein gene and plasma lipoproteins in the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* **148**: 337-343.

46. Hagan, D. L., B. Kienzle, H. Jamil, and N. Hariharan. 1994. Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol.Chem.* **269**: 28737-28744.

47. Lin, M. C., D. Gordon, and J. R. Wetterau. 1995. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res.* **36**: 1073-1081.

Figure 1

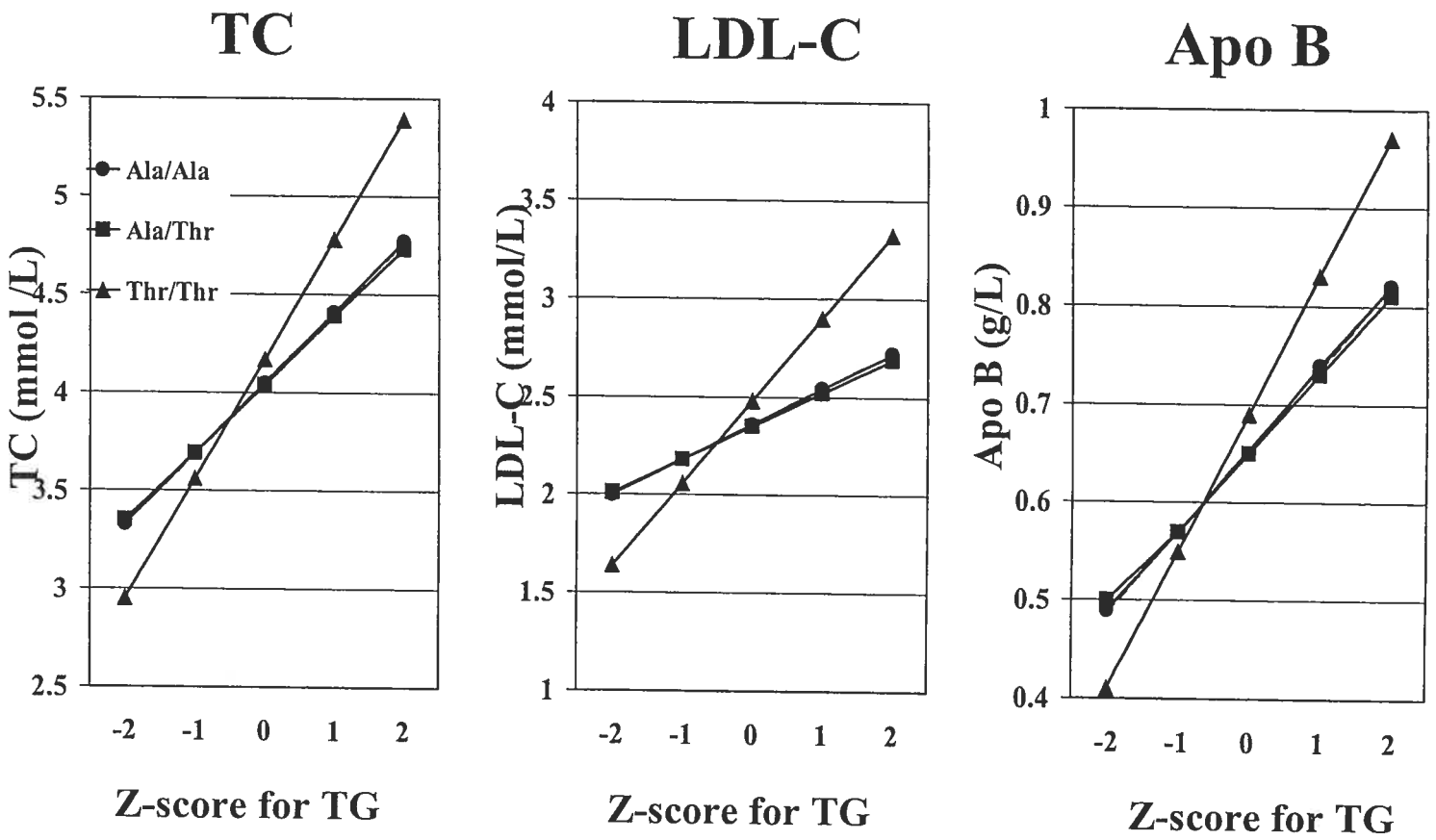
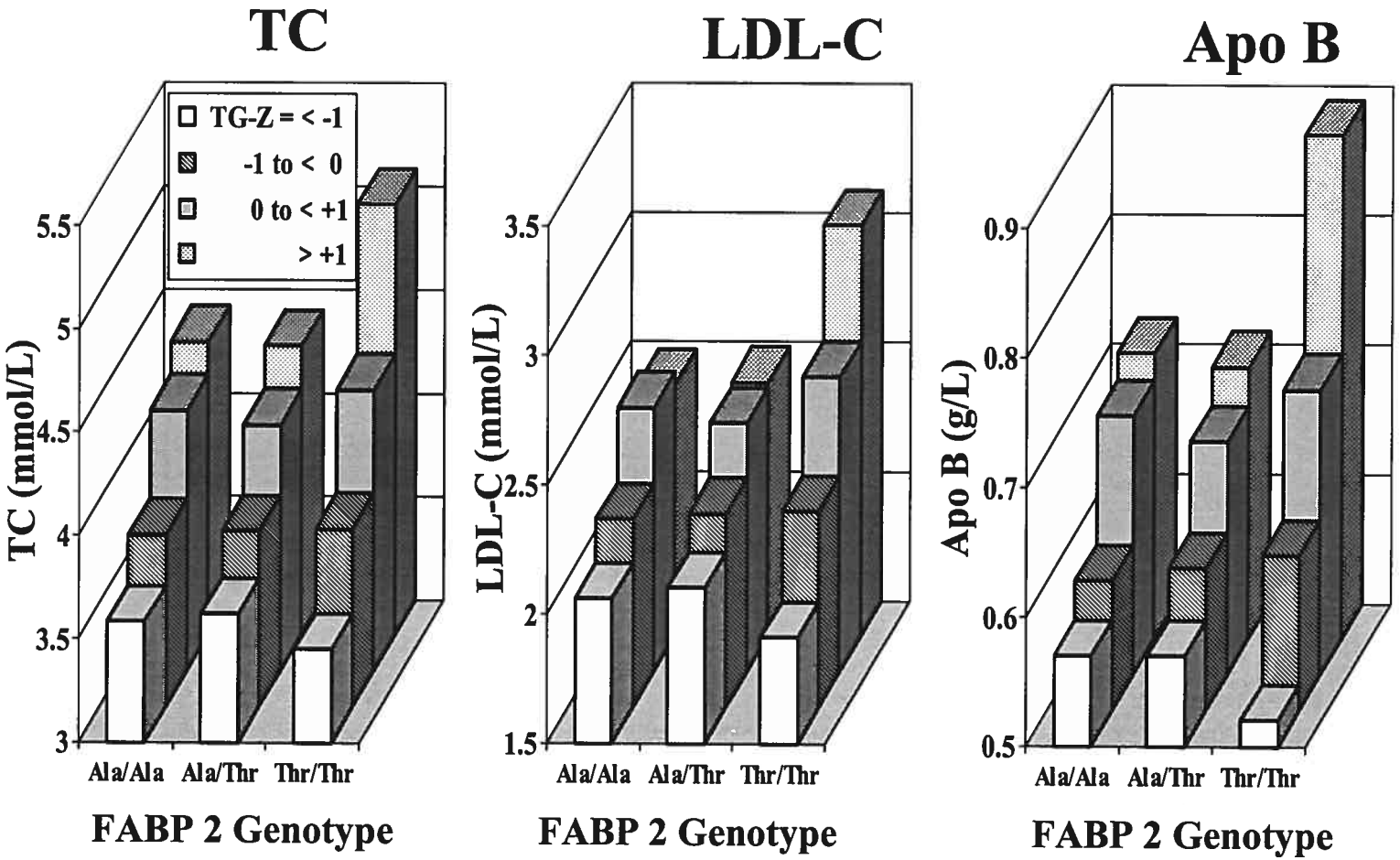

TC
LDL-C
Apo B
Ala/Ala
Ala/Thr
Thr/Thr
TC (mmol /L)
LDL-C (mmol/L)
Apo B (g/L)
Z-score for TG
Z-score for TG
Z-score for TG

Figure 2


TC
TG-Z = < -1
-1 to < 0
0 to < +1
> +1
TC (mmol/L)
5.5
5
4.5
4
3.5
3
Ala/Ala
Ala/Thr
Thr/Thr
FABP 2 Genotype
LDL-C
LDL-C (mmol/L)
3.5
3
2.5
2
1.5
Ala/Ala
Ala/Thr
Thr/Thr
FABP 2 Genotype
Apo B
Apo B (g/L)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
Ala/Ala
Ala/Thr
Thr/Thr
FABP 2 Genotype

Cinquième article

DISTRIBUTION OF LDL PARTICLE SIZE IN A POPULATION-BASED SAMPLE OF CHILDREN AND ADOLESCENTS AND RELATION WITH OTHER CARDIOVASCULAR FACTORS

Pour cet article, j'ai mis au point la technique de détermination de la taille des particules LDL, effectué l'évaluation pour l'ensemble des 2249 sujets, conçu le plan d'analyse des données et participé à l'analyse statistique en vue de la rédaction de l'article. En ce qui concerne la rédaction, ma contribution a été majeure, tout en collaborant étroitement avec mes directeursde recherche, le Dr Emile Levy et Dr Marie Lambert.

Article soumis à Clinical Chemistry

Distribution of LDL particle size in a population-based sample of children and adolescents and relation with other cardiovascular risk factors

Simona Stan [1], Emile Levy [1], Edgard E. Delvin [2], James A. Hanley [4], Benoît Lamarche [5], Jennifer O'Loughlin [4], Gilles Paradis [4], and Marie Lambert [3]

Departments of Nutrition [1], Clinical Biochemistry [2], and Pediatrics [3], Ste-Justine Hospital and Université de Montréal, 3175 Côte-Ste-Catherine, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5.

Department of Epidemiology and Biostatistics [4], McGill University, 1020 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, Canada, H3A 1A2.

INAF [5], Université Laval, 2440 Boul. Hochelaga, Ste-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4

Abbreviated title: LDL particle size and CVD risk factors in youth

Corresponding author: Marie Lambert, MD, Medical Genetics Division, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte-Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5.
Telephone: 514-345-4736, Fax: 514-345-4766,
E-Mail: [redacted]

ABSTRACT

Background: Smaller and denser LDL particles are associated with an increased risk for cardiovascular diseases (CVD). In youth, limited data are available on the distribution of LDL particle size as well as on its association with other CVD risk factors.

Methods: We determined LDL peak particle size by nondenaturing 2-16% gradient-gel electrophoresis in a representative sample of 2249 youths aged 9, 13 and 16 years who participated in a school-based survey conducted in 1999 in the province of Quebec, Canada. Standardized clinical measurements and fasting plasma lipid, glucose and insulin concentrations were available.

Results: The distribution of LDL peak particle size was Gaussian. The 5^{th}, median and 95^{th} percentile values by age and sex ranged from 255.5 to 258.6 Å, 262.1 to 263.2 Å and 268.1 to 269.5 Å, respectively. The prevalence of the small dense LDL phenotype (LDL peak particle size ≤ 255 Å) was 10.4% in participants with insulin resistance syndrome (IRS) in contrast to 0.9% in those without IRS. In a multiple regression analysis, the association of LDL size with other CVD risk factors (apolipoprotein B, HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), insulin, body mass index) was strongest with TGs and HDL-C: a 1 SD increase in $\log_e$-transformed TGs was associated with a 1.2 Å reduction in LDL size and a 1 SD increase in HDL-C was associated with a 1.1 Å increase in LDL size.

Conclusions: Although the small dense LDL phenotype is less prevalent in youth than adults, its prevalence is clearly increased in childhood IRS. Metabolic correlates of LDL size are similar in youth and adults.

ABBREVIATIONS: Apo, apolipoprotein; BMI, body mass index; BP, blood pressure; CI, confidence interval; CV, coefficient of variation; CVD, cardiovascular disease; FFA, free fatty acids; HDL-C, HDL cholesterol; IRS, insulin resistance syndrome; LDL-C, LDL cholesterol; NMR, nuclear magnetic resonance; PAGGE, polyacrylamide gradient-gel electrophoresis; TC, total cholesterol;TG,triglyceride.

INTRODUCTION

LDL particles are a heterogeneous mixture of lipoproteins differing in their densities, sizes, lipid composition, electrical charges and pathologic properties [1]. The LDL subclass distribution is influenced by several factors including age, sex, estrogen therapy, diet, abdominal adiposity, insulin resistance, diabetic status and genetic factors [2-12].

Electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gradient-gel (PAGGE) [13, 14] is the most widely used technique to estimate LDL particle size. In epidemiological studies, the most common index to describe LDL particle size is the diameter of the most abundant subspecies, which has been named the LDL peak particle size. Using mathematical modeling that separated LDL size tracings on PAGGE into Gaussian curves, Austin et al [11] identified two subclass patterns: pattern A with a predominance of large and buoyant LDL particles of more than 255 Å, and pattern B with a predominance of small and dense LDLs of 255 Å or less. Despite the fact that PAGGE can be suitable for large-scale clinical determination of LDL particle size [15], it has the drawback of being labor-intensive. As a result, several lipid indexes have been proposed as alternatives to estimate LDL size. Surrogate markers of LDL size include: the ratio of LDL cholesterol (LDL-C) concentration to apolipoprotein (apo) B concentration [16, 17], the total (TC) to HDL cholesterol (HDL-C) ratio [18], the apoB to HDL-C ratio [19], the triglyceride (TG) to HDL-C or log (TG to HDL-C) ratios [19-22] and the TG concentration itself. Their use as proxy measure of LDL size remains controversial.

Data from case-control and prospective studies have suggested that small dense LDLs are associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD) [23, 24]. However, the relationship between small dense LDLs and CVD may not be independent of other risk factors such as plasma TG and HDL-C concentrations. In fact, small dense LDLs are a hallmark of the dyslipidemia characteristic of the insulin resistance syndrome (IRS), which includes elevated TGs and decreased HDL-C [8, 25-27]. The increased atherogenicity of small dense LDLs might be related to their greater propensity for uptake by arterial tissue [28], their decreased LDL-receptor mediated uptake in favor of an increased binding to scavenger receptor [29, 30] and increased proteoglycan binding [31] and their greater susceptibility to oxidative stress [32, 33].

Most of the studies examining LDL size and its relationships with other CVD risk factors have been conducted in adults. Limited information on LDL size and its metabolic correlates is available for children and adolescents [18, 34-42]. To gain more information on this subject matter would be important because it is recognized that the process of atherosclerosis begins in childhood [43, 44] and that IRS is frequent in youth [45]. The objectives of this study thus were: (*a*) to describe the distribution of LDL particle sizes in a population-based sample of children and adolescents; (*b*) to examine the relationship between LDL particle size as estimated by PAGGE and by other surrogate markers; (*c*) to determine the prevalence of the small dense LDL phenotype in youth with IRS compared to those without IRS; and (*d*) to study the association between LDL particle size and other CVD risk factors.

MATERIALS AND METHODS

STUDY POPULATION

The study population included participants in the Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey (QCAHS), a school-based survey conducted between January and May 1999, in the province of Quebec, Canada. The survey design and methods have been reported previously [46] and are only summarized here. The QCAHS used a cluster sampling design to draw three independent provincially representative samples of youth 9, 13 and 16 years of age (one sample per age). The sampling frame represented 97% of all youth targeted. Response percentages were 83.4% (1267 of 1520 eligible children), 79.2% (1186/1498), and 77.6% (1160/1495) for questionnaire and anthropometric measures, among 9-, 13- and 16-year-olds, respectively, and were 51.5% (783/1520), 54.6% (818/1498) and 58.5% (874/1495) for blood sampling, among 9-, 13- and 16-year-olds, respectively. French Canadians comprised 79.6% of the sample. Of 2475 blood specimens available, 226 were excluded because 107 parents refused consent for analyses other than glucose and lipids and 119 samples were thawed on arrival at the laboratory or were of insufficient amount. Age-specific comparisons of youth who provided blood samples (n=2249) with those for whom samples were not available (n=1364), revealed no statistically significant differences in sex, cigarette smoking, mean BMI, parental income and parental education. The study was approved by the Ethics Review Board

of Ste-Justine Hospital. Written informed assent and consent were obtained from the participants and their legal guardians.

CLINICAL VARIABLES

Height, weight and blood pressure (BP) were measured according to standardized protocols [46]. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. Age- and sex-specific percentile cut point values were estimated from sample-specific distributions of the variables of interest (BMI, BP, insulin, TG, HDL-C). BP cut points were also height specific. Children with BMI $\geq 85^{th}$ percentile values were categorized as overweight. Hyperinsulinemia was defined as a fasting plasma insulin value $\geq 75^{th}$ percentile. Although IRS is a well-recognized clinical entity, there is no internationally accepted definition of childhood IRS. For the purpose of our analyses, an individual was classified as having IRS if she/he had hyperinsulinemia and at least two of five other characteristics: overweight, systolic BP $\geq 75^{th}$ percentile, TG $\geq 75^{th}$ percentile, HDL-C $\leq 25^{th}$ percentile and glucose ≥ 6.1 mmol/L [45]. Values for age- and sex-specific cut points for the variables used to define IRS are presented in Table 1. For comparison purposes, we modified our initial definition of IRS by using the age and sex-specific 85^{th} percentile values of BMI, according to the US-CDC growth charts [47], to define overweight, and the National High Blood Pressure Education Program 90^{th} percentile cut points to define high systolic BP [48]. Current smokers aged 13 and 16 years were defined as those who

responded positively to: During the past 30 days, did you smoke cigarettes, even just a few puffs? This question was not asked of 9-year-olds. Only 2.1% of this age responded positively to: Have you ever smoked a whole cigarette? Therefore, all 9-year-olds were classified as non smokers. Subjects who consumed alcohol regularly were defined as those who responded "about once a week" to: During the last 12 months, how often did you drink alcohol? (just to taste, less than once a month, about once a month, about once a week).

BIOCHEMICAL ANALYSES

Overnight fasting blood samples were collected in 1g/L EDTA collection tubes that were kept on ice until centrifugation. Plasma was separated on site within 45 minutes of collection, frozen on dry ice, and sent within 24 hours to the laboratory where specimens were stored at -80°C until analysis. Fasting plasma insulin, glucose, TC, TG, HDL-C and free fatty acid (FFA) concentrations were measured as previously described [45, 46, 49]. LDL-C was calculated by the Friedewald formula [50]. ApoA1 and B were determined by nephelometry (Beckman Array Protein System).

LDL peak particle size was measured by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gradient-gel. Electrophoresis of 5 µl of plasma was carried-out at 4° C in 2-16% polyacrylamide gradient-gels at 125 volts for 24 hours in a Tris 0.09 M-boric acid 0.08 M-Na_2EDTA 0.003 M buffer, pH 8.3. The application of the samples was preceded by a pre-run at 125 volts for 15

minutes. Samples were loaded in 20% sucrose - 0.1% bromophenol blue loading buffer and the voltage was set at 70 volts for 20 minutes prior to the main migration at 125 volts for 24 hours. Gels were stained for proteins in a 50% ethanol-10% acetic acid-0.1% Coomassie Blue R-250 solution and destained in multiple changes of a 20% ethanol-10% acetic acid solution. Gels were scanned using a densitometry image analyzer (Fluorchem, Alpha Innotech) and analyzed by the ImageMaster 1D Prime, Version 2.01 software (Pharmacia Biotech). We estimated the diameter of the major peak in each sample (LDL peak particle size) based on the migration of pooled plasma standards of known diameter [7]. Sample application and migration differences were monitored with two internal protein standards, ferritin (122 Å) and thyroglobulin (170 Å) (Amersham Pharmacia Biotech). Inter-gel coefficient of variation (CV) assessed with two plasma samples were 0.44% at 264.0 Å and 0.42% at 258.5 Å (n = 112 and 113, respectively). Duplicate measurements of a systematic random sample of 1 in 20 specimens analyzed on different days, showed a median CV across specimens of 0.21% (5^{th} and 95^{th} percentiles: 0.03 and 0.62%; n = 112).

STATISTICAL ANALYSES

We used the values of the sample percentiles to estimate the values of the population percentiles of interest. Nonparametric confidence intervals (CI) for the cut points of interest were constructed using the algorithm described by Hutson [51]. When comparing percentile values between sexes or across ages, we concluded that they were significantly different if their respective

95% CI did not overlap. Chi-square statistics was used to compare the prevalence of the small dense LDL phenotype (≤ 255 Å) by age, sex, BMI category and IRS status. Pearson correlation coefficients were computed to assess the associations between LDL size and its surrogate markers and between LDL size and other metabolic variables. We next used mixed multiple linear regression to study the independent associations between LDL size and other metabolic variables. Independent variables were treated as fixed effects and clustering between subjects in the same school was treated as a random effect. Because we pooled all participants, age- and sex-specific Z-scores for apoB, HDL-C, TG, insulin and BMI were used in regression analyses. Z-scores were estimated from the study distributions. To take the complex sampling design into account, sampling weights and clustering effects were estimated and incorporated into all our computations except correlations and regressions. The distributions of TG, insulin, FFA and BMI were not Gaussian and these variables were $\log_e$-transformed for statistical analyses. Statistical analyses were performed with SAS statistical software (SAS Institute, Inc) and SUDAAN (Research Triangle Institute).

RESULTS

The characteristics of the participants are listed in Table 2. In this pediatric population, the distribution of LDL peak particle size was Gaussian (Fig) and remarkably tight with a CV of 1.34% across all age and sex groups. Mean LDL size was significantly higher in girls than boys (263.0 Å versus.

262.6 Å, $p = 0.018$) and lower for the 16-year-olds compared to the 9- and 13-year-olds (262.4 Å versus 263.0 Å and 263.0 Å respectively, $p = 0.047$ and 0.041).

The means and values of selected percentiles for LDL peak particle size are presented by age and sex in Table 3. For each percentile examined, no difference was detected between 9-year-old boys and girls. Thirteen-year-old girls had higher values than same-age boys for the 25th and 50th percentiles while in 16-year-olds, girls had higher value than boys for the 5th percentile only. Comparisons across ages revealed lower 25th, 50th, and 75th percentile values for 16-year-olds compared with 9-year-olds, in boys only.

Two percent of youth had a small dense LDL phenotype (LDL peak particle size ≤ 255 Å). There were no differences by age or by sex (Table 4). Seven percent of individuals with a BMI greater or equal to the 85th percentile and 10.4% of individuals with IRS had a small dense LDL phenotype, which was significantly different from individuals with a BMI below the 85th percentile and without IRS, respectively. Because there is no internationally accepted definition of childhood IRS, in order to provide some comparisons, we modified our definition of IRS by replacing the initial cut points used to define two of the IRS criteria, overweight and high systolic BP, by the age and sex-specific 85th percentile values according to the US-CDC growth charts for BMI [47] and by the National High Blood Pressure Education Program 90th percentile cut points for systolic BP [48]. The prevalence of the small, dense LDL phenotype among those classified as having and not having IRS according to this modified definition (10.0% and 1.0%, respectively) was

similar to the prevalence of the small, dense LDL phenotype among those classified as having and not having IRS according to our initial definition of IRS (Tables 1 and 4).

Because it would be useful to have an estimate of LDL size based on commonly measured lipid concentrations we investigated the association between surrogate markers of LDL size suggested in the literature [16-22] and both the LDL size estimated by PAGGE and the small dense LDL phenotype. We observed moderate correlations between LDL size and, TG to HDL-C molar ratio, the logarithm of this ratio and the logarithm of TG concentration: correlation coefficients by age and sex ranged from -0.50 to -0.57, from -0.47 to -0.56 and from - 0.39 to - 0.50, respectively (Table 5). The associations between LDL size and other proxy measures (LDL-C/apoB, TC/HDL-C and apoB/HDL-C) were weaker. Various cut points for the TG to HDL-C molar ratio have been suggested to identify adults with the small dense LDL phenotype [19, 21, 22] including 0.9, 1.33, and 1.7. In our pediatric population, the sensitivity and specificity of these cut points were 85.9% and 78.2%, 76.1% and 93.5%, 67.3% and 97.6%, respectively.

We next examined the association between LDL size and other CVD risk factors (Table 6). The strongest correlations were observed between LDL size and both TG (negative) and HDL-C (positive): correlation coefficients by age and sex ranged from -0.39 to -0.50 and from 0.29 to 0.47, respectively. Significant but weaker negative associations were observed between LDL size and apoB (correlation coefficients = - 0.14 to - 0.33, by age and sex). Weak negative associations were observed between LDL size and both TC

and LDL-C only in 16-year-olds. BMI and insulin levels correlated negatively and weakly with LDL size except in 13- and 16-year-old girls where no significant associations were detected. Finally we did not detect significant correlations between LDL size and, glucose or FFA.

Because many CVD risk factors correlated with LDL peak particle size are also inter-correlated, we performed multiple regression analyses to examine their independent contributions to variation in LDL size. We included in multiple regression analyses variables that had a significant association with LDL size in univariate analyses (Table 6). ApoB was highly correlated with TC and LDL-C and, apoA1 was highly correlated with HDL-C (all correlation coefficients ≥ 0.8); therefore, only apoB and HDL-C were tested as potential independent variables in multiple regression analyses. We did not detect significant associations between LDL size and alcohol intake or cigarette smoking status (p-values = 0.715 and 0.370, respectively); thus, they were not included in multiple regression analyses. Because there were no significant heterogeneity in the effects of the independent variables (apoB, HDL-C, TG, insulin, BMI) by age and sex (all interaction p-values > 0.1 with exception of the interaction BMI*sex for which the p-value = 0.023), age and sex groups were pooled in multiple regression analyses. After adjustment for age, sex, apoB, HDL-C, insulin and BMI, LDL size remained strongly negatively associated with TG: a 1 SD increase in $\log_e$TG was associated with a 1.2 Å decrease in LDL size (Table 7). Similarly, after adjustment for all the other variables in the model, HDL-C remained strongly positively associated with LDL size: a 1 SD increase in HDL-C was associated with a

1.1 Å increase in LDL size. In contrast, after adjustment, the association between BMI and LDL size was no longer significant. It is interesting to note that in the multivariable analysis the association between insulin and LDL size stayed significant but was positive. Finally, similar to univariable association analyses, girls had a mean LDL size slightly larger than boys in multivariable analysis and 16-year-olds had smaller mean LDL size than 13- and 9-year-olds.

DISCUSSION

To date limited information is available on the distribution of LDL size in population-based samples of children [34, 36, 38, 39] and adolescents [39]. Moreover methods used to assess LDL size vary across studies, which limits comparisons between populations. Arisaka et al [34], Shimabukuro et al [38] and the present study (QCAHS) used PAGGE to determine particle size while the investigators of the Bogalusa Heart Study (BHS) (39) and Shea et al [36] used nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Agreement between methods is far from perfect and therefore the methods are not interchangeable [52]. In spite of these methodological differences, significantly higher mean LDL size was found in females compared to males in the BHS [39], the QCAHS and in Japanese children [38]. However these differences by sex are small and their clinical significance remains to be determined. LDL size showed no consistent trend with age among 10-17-year-old Black and White youth in the BHS [39], whereas 16-year-olds had

significantly decreased LDL size compared to 13- and 9-year-olds in the QCAHS. Only 7-13-year-old children were evaluated in the Japanese studies [34, 38] and the effect of age on LDL size was not discussed. Whereas studies concur on differences by sex in LDL size in youth, differences by sex that are also observed in adults [53, 54], further investigations are needed to confirm differences by age in children and adolescents.

The prevalence of the small dense LDL phenotype (pattern B, ≤ 255 Å) was only 2% in our sample and was similar between sexes and across ages. Arisaka et al [34] reported a prevalence of 9.3%, which was similar by sex, in pre-pubertal Japanese children while Shimabukuro et al [38] reported a prevalence of 10.8% in pre-pubertal Japanese boys and 4.4% in pre-pubertal Japanese girls. In the BHS [39], the prevalence of the NMR-based small dense LDL phenotype (average LDL size ≤ 205 nm) ranged from 5% in Blacks boys and girls to 13% in White boys. In contrast, the prevalence of the small dense LDL phenotype as assessed by PAGGE in the Framingham Offspring Study was 33% in adult men but markedly lower in premenopausal women (5%), and in postmenopausal women (13%) (54). Because the conformational alterations characteristic of small dense LDLs are likely associated with an increased atherogenecity [1, 23], the low prevalence of this trait in youth is reassuring. However, a sizeable proportion of youth who are overweight (6.8%) or who have IRS (10.4%) might have already experienced the burden of small dense LDLs.

Our data are concordant with studies conducted in adults [19-22] showing that the TG to HDL-C molar ratio (or the log-transformed ratio) is the

most simple and best lipid index to predict LDL particle size, better than either log_eTG or HDL-C alone. In adults, correlations between LDL particle size and TG to HDL-C molar ratio (or the log-transformed ratio) ranged from - 0.64 to - 0.78 [19-22], which is stronger than correlations observed in the present study. As expected, this surrogate marker has limitations in its ability to predict the small dense LDL phenotype. In the QCAHS, even when using the most sensitive cut point suggested in adults (0.9), there were 14% false negatives and a large number of false positives (22%).

Similar to adults [7, 8, 25, 55-59], fasting plasma TG concentration was the strongest independent correlate (negative) of LDL peak particle size in the present pediatric study. This is consistent with the prevailing model for the generation of small LDL particles, which proposes that an increased hepatic production of TG-rich lipoproteins (i.e. VLDLs) associated with insulin resistance, leads to TG-enriched LDL particles through cholesteryl ester transfer protein-mediated exchange of cholesteryl esters from LDL to VLDL particles and of TGs from VLDL to LDL particles. Then, TG-enriched LDLs become good substrate for hepatic lipase, which hydrolyses TGs in LDLs, resulting in small dense LDLs [1]. The weak correlation between LDL size, which depends on core lipid content, and apoB concentration, which is related to particle number, underscores that both LDL composition and LDL particle number should be considered in the assessment of CVD risk.

An unexpected finding of our study was that after adjustment for the other metabolic components of IRS (apoB, TG, HDL-C and BMI), we detected a positive association between fasting insulin and LDL size suggesting that

hyperinsulinemia is associated with a larger LDL size. This appears inconsistent with the known association between IRS and a small LDL size. However, in most adult studies, insulin sensitivity was not independently associated with LDL size and the effect of insulin resistance on LDL size could be explained by the effect of insulin resistance or hyperinsulinism on VLDL metabolism [7, 8, 25, 55-59]. Moreover, plasma insulin concentrations reflect both pancreatic insulin secretion and peripheral insulin resistance. Our data suggest that beyond the effect of insulin resistance on VLDL production/secretion, which leads to smaller LDL size, insulin concentrations could also influence VLDL subclass distribution and thereby LDL subclass distribution. In fact, it has been proposed that there is a channeling within the VLDL-IDL-LDL delipidation cascade such that parallel processing pathways generate different IDL and LDL products from different TG-rich lipoprotein precursors [1]. Large TG-rich VLDL-1 are thought to be the precursors of small dense LDLs. Furthermore, in normolipidemic individuals and in insulin-sensitive obese subjects, it has been reported that acute hyperinsulinemia reduced large TG-rich VLDL-1 concentration but had little effect on VLDL-2 [60, 61]. Therefore there is experimental evidence supporting our observation of a positive association between LDL size and insulin concentration after adjustment for the other metabolic components of IRS. This will require confirmation in other large population-based sample of youth and adults.

In our pediatric population, age, sex and the metabolic variables explained 30% of the variation in LDL peak particle size, which is similar to values reported for Japanese schoolchildren (22.9-28.1%) [38] but lower than

those reported in the Framingham Offspring Study (50-57%) [54]. This suggests that the relative importance of genetic and environmental determinants of LDL size differs between children and adults.

In conclusion, the metabolic correlates of LDL size are similar between youth and adults. Although the small dense LDL phenotype is less prevalent in youths than adults, its prevalence is clearly increased in childhood IRS, which supports the need for early prevention of CVD risk factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The survey was funded by the Quebec Ministry of Health and Social Services and by Health Canada. The study on cardiovascular risk factors in youth is funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-44027). JOL is holder of the Canada Research Chair in the childhood determinants of adult chronic disease. BL is holder of the Canada Research Chair in nutrition, functional foods and cardiovascular health. SS was supported by a CIHR doctoral award.

REFERENCES

1. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. [Review]. J Lipid Res 2002;43:1363-79.
2. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PWF, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on Low Density Lipoprotein subfraction distribution. Arteriosclerosis 1987;7:483-90.
3. Campos H, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, O'Hanesian MA, Krauss RM. Differential effects of estrogen on low-density lipoprotein subclasses in healthy postmenopausal women. Metabolism 1993;42:1153-8.
4. Mauger JF, Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Jauhiainen M, Ehnholm C, Lamarche B. Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. Am J Clin Nutr 2003;78:370-5.
5. Sjogren P, Rosell M, Skoglund-Andersson C, Zdravkovic S, Vessby B, de Faire U, et al. Milk-derived fatty acids are associated with a more favorable LDL particle size distribution in healthy men. J Nutr 2004;134:1729-35.
6. Terry RB, Wood PD, Haskell WL, Stefanick ML, Krauss RM. Regional adiposity patterns in relation to lipids, lipoprotein cholesterol, and lipoprotein subfraction mass in men. J Clin Endocrinol Metab 1989;68:191-9.
7. Tchernof A, Lamarche B, Prud'Homme D, Nadeau A, Moorjani S, Labrie F, et al. The dense LDL phenotype. Association with plasma

lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. Diabetes Care 1996;19:629-37.

8. Reaven GM, Chen YDI, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density lipoprotein particles. J Clin Invest 1993;92:141-6.

9. Selby JV, Austin MA, Newman B, Zhang D, Quesenberry Jr. C, Mayer EJ, Krauss RM. LDL subclass phenotypes and the insulin resistance syndrome in women. Circulation 1993;88:381-7.

10. Feingold KR, Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Krauss RM. LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. Arterioscler Thromb 1992;12:1496-502.

11. Austin M, Krauss RM. Genetic control of low-density-lipoprotein subclasses. Lancet 1986;2:592-5.

12. Bosse Y, Perusse L, Vohl MC. Genetics of LDL particle heterogeneity: from genetic epidemiology to DNA-based variations. [Review]. J Lipid Res 2004;45:1008-26.

13. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoprotein in normal humans. J Lipid Res 1982;23:97-104.

14. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PDS. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. J Lipid Res 1990;31:1131-9.

15. Krauss RM, Blanche PJ. Detection and quantitation of LDL subfractions. Curr Opin Lipidol 1992;3:377-83.

16. Wägner AM, Jorba O, Rigla M, Alonso E, Ordóñez-Llanos J, Pérez A. LDL-cholesterol/apolipoportein B ratio is a good predictor of LDL phenotype B in type 2 diabetes. Acta Diabetol 2002;39:215-20.

17. Tallis GA, Shephard MD, Sobecki S, Whiting MJ. The total apolipoprotein B/LDL-cholesterol ratio does not predict LDL particle size. Clin Chim Acta 1995;240:63-73.

18. Kang H-S, Gutin B, Barbeau P, Litaker MS, Allison J, Le N-A. Low-density lipoprotein particle size, central obesity, cardiovascular fitness, and insulin resistance syndrome markers in obese youths. Int J Obes Relat Metab Disord 2002;26:1030-5.

19. Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S. Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. Diabetes Care 2000;23:1679-85.

20. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index : correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apo B-lipoprotein-depleted plasma (FER_{HDL}). Clin Biochem 2001;34,583-8.

21. Maruyama C, Imamura K, Teramoto T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. J Atheroscler Thromb 2003;10:186-91.

22. Hanak V, Munoz J, Teague J, Stanley A Jr, Bittner V. Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of

the low-density lipoprotein phenotype B. Am J Cardiol 2004 ;94:219-22.

23. Kwiterovich PO Jr. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. [Review]. Am J Cardiol. 2002;90:30i-47i.

24. Sacks FM, Campos H. Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. [Review]. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:4525-32.

25. Howard BV, Mayer-Davis EJ, Goff D, Zaccaro DJ, Laws A, Robbins DC et al. Relationships between insulin resistance and lipoproteins in nondiabetic African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Metabolism 1998:47:1174-9.

26. Friedlander Y, Kidron M, Caslake M, Lamb T, McConnell M, Bar-On H. Low density lipoprotein particle size and risk factors of insulin resistance syndrome. Atherosclerosis 2000;148:141-9.

27. Hulthe J, Bokemark L, Wikstrand J, Fagerberg B. The metabolic syndrome, LDL particle size, and atherosclerosis; The Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:2140-7.

28. Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, Wiklund O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. Atherosclerosis 1996;123:43-56.

29. Campos H, Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM. Differences in receptor binding of LDL subfractions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:794-801.

30. Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. Lipid Res 1998;39:1263-73.

31. Anber V, Millar JS, McConnell M, Shepherd J, Packard CJ. Interaction of very-low-density, intermediate-density, and low-density lipoproteins with human arterial wall proteoglycans. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:2507-14.

32. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. Am J Med 1993;94:350-6.

33. Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. Am J Med 2001;110:103-10.

34. Arisaka O, Kojima M, Yamazaki Y, Kanazawa S, Koyama S, Shimura N, Okada T. Relationship between the presence of small, dense low-density lipoprotein and plasma lipid phenotypes in Japanese children. J Atheroscler Thromb 2004;11:220-3.

35. Kaitosaari T, Ronnemaa T, Raitakari O, Talvia S, Kallio K, Volanen I et al. Effect of 7-year infancy-onset dietary intervention on serum lipoproteins and lipoprotein subclasses in healthy children in the prospective, randomized Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project for Children (STRIP) study. Circulation 2003;108:672-7.

36. Shea S, Aymong E, Zybert P, Berglund L, Shamoon H, Deckelbaum RJ, Basch CE. Fasting plasma insulin modulates lipid levels and particle sizes in 2- to 3-year-old children. Obes Res 2003;11:709-21.

37. Ohta T, Kakiuti Y, Kurahara K, Saku K, Nagata N, Matsuda I. Fractional esterification rate of cholesterol in high density lipoprotein is correlated with low density lipoprotein particle size in children. J Lipid Res 1997;38:139-46.

38. Shimabukuro T, Sunagawa M, Ohta T. Low-density lipoprotein particle size and its regulatory factors in school children. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2923-7.

39. Freedman DS, Bowman BA, Otvos JD, Srinivasan SR, Berenson GS. Levels and correlates of LDL and VLDL particle sizes among children: the Bogalusa Heart Study. Atherosclerosis 2000;152:441-9.

40. Williams PT, Krauss RM. Associations of age, adiposity, menopause, and alcohol intake with low-density lipoprotein subclasses. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:1082-90.

41. Arisaka O, Fujiwara S, Yabuta K, Mokuno H, Mitugi Y, Miyake N. Characterization of low-density lipoprotein subclasses in children. Metabolism 1997;46:146-8.

42. Steinbeck KS, Bermingham MA, Mahajan D, Baur LA. Low-density lipoprotein subclasses in children under 10 years of age. J Paediatr Child Health 2001;37:550-3.

43. Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, Paridon S, Bazzarre T. Cardiovascular health in childhood: A statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. Circulation 2002;106:143-60.

44. McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. [Review]. Am J Clin Nutr 2000;72:1307S-15S.

45. Lambert M, Paradis G, O'Loughlin J, Delvin EE, Hanley JA, Levy E. Insulin resistance syndrome in a representative sample of children and adolescents from Quebec, Canada

Int J Obes Relat Metab Disord 2004;28:833-41.

46. Paradis G, Lambert M, O'Loughlin J, Lavallee C, Aubin J, Berthiaume P et al. The Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey: design and methods of a cardiovascular risk factor survey for youth. Can J Cardiol 2003;19:523-31.

47. CDC Growth Charts: United States. 28 pp. (PHS) 2000-1250. http://www.cdc.gov/nchs/data/ad/ad314.pdf.

48. Update on the 1987 task force report on high blood pressure in children and adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. Pediatrics. 1996;98:649-658.

49. Allard P, Delvin EE, Paradis G, Hanley JA, O'Loughlin J, Lavallee C et al. Distribution of fasting plasma insulin, free fatty acids, and glucose concentrations and of homeostasis model assessment of insulin resistance in a representative sample of Quebec children and adolescents. Clin Chem 2003;49:644-9.

50. Friedewald WF, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1977;18:499-502.

51. Hutson AD. Calculating nonparametric confidence intervals for quantiles using fractional order statistics. J Appl Stat 1999;26:343-53.

52. Witte DR, Taskinen MR, Perttunen-Nio H, Van Tol A, Livingstone S, Colhoun HM. Study of agreement between LDL size as measured by nuclear magnetic resonance and gradient gel electrophoresis. J Lipid Res 2004;45:1069-76.

53. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalaurova I, Cupples LA, Parise H et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. Clin Chem 2004;50:1189-200.

54. Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW et al. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb 1992;12:1410-9.

55. Lahdenpera S, Sane T, Vuorinen-Markkola H, Knudsen P, Taskinen MR. LDL particle size in mildly hypertriglyceridemic subjects: no relation to insulin resistance or diabetes. Atherosclerosis 1995;113:227-36.

56. Slyper AH, Zvereva S, Schectman G, Hoffmann RG, Mueller RA, Walker JA. Insulin resistance is not a major determinant of low-density lipoprotein particle size. Metabolism 1997;46:1275-80.

57. Mykkanen L, Haffner SM, Rainwater DL, Karhapaa P, Miettinen H, Laakso M. Relationship of LDL size to insulin sensitivity in normoglycemic men. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:1447-53.

58. Ambrosch A, Muhlen I, Kopf D, Augustin W, Dierkes J, Konig W et al. LDL size distribution in relation to insulin sensitivity and lipoprotein pattern in young and healthy subjects. Diabetes Care 1998;21:2077-84.

59. Fagerberg B, Hulthe J, Bokemark L, Wikstrand J. Low-density lipoprotein particle size, insulin resistance, and proinsulin in a population sample of 58-year-old men. Metabolism 2001;50:120-4.

60. Malmstrom R, Packard CJ, Watson TD, Rannikko S, Caslake M, Bedford D et al. Metabolic basis of hypotriglyceridemic effects of insulin in normal men. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:1454-64.

61. Bioletto S, Golay A, Munger R, Kalix B, James RW. Acute hyperinsulinemia and very-low-density and low-density lipoprotein subfractions in obese subjects. Am J Clin Nutr 2000;71:443-9.

FIGURE LEGEND

Figure: Frequency distribution of LDL peak particle size in a representative sample of Quebec children and adolescents 9, 13 and 16 years of age. The arrow indicates the cut point (≤ 255 Å) used in adults to define the small, dense LDL phenotype.

Table 1.
Values for the age- and sex-specific cut points[a] for the variables used to define IRS.

Sex	Age, years	BMI, kg/m^2	Insulin, pmol/L	Triglyceride mmol/L	HDL-C mmol/L
Boys	9	20.47	35.01	0.85	1.22
	13	23.95	60.04	1.05	1.11
	16	25.90	50.70	1.08	1.00
Girls	9	20.62	40.64	0.96	1.20
	13	23.90	69.92	1.07	1.13
	16	25.95	62.76	1.18	1.13

[a], these cut points correspond to the 85^{th} percentile values of the study population distributions for BMI, the 75^{th} percentile for insulin and TG, and the 25^{th} percentile for HDL-C.

Table 2. Characteristics of participants. [a]

	Boys			Girls		
	9 years (n =342)	13 years (n =371)	16 years (n = 77)	9 years (n =369)	13 years (n =353)	16 years (n =437)
BMI, kg/m^2	17.3(3.2)	20.3(3.8)	22.5(3.9)	17.6(3.5)	20.7(4.3)	122.2(4.1)
BP, mmHg Systolic Diastolic	103.1(9.9) 56.4 (6.2)	112.4(11.7) 58.2 (6.6)	123.6(13.5) 60.9 (7.1)	101.8(9.2) 56.4 (5.9)	111.1(11.3) 59.1 (7.1)	114.0(11.0 61.7 (7.4)
TC, mmol/L	4.06(0.66)	3.86 (0.65)	3.68 (0.70)	4.22(0.72)	4.04 (0.69)	4.14(0.82)
LDL-C, mmol/L	2.33(0.55)	2.20 (0.55)	2.12 (0.58)	2.48(0.62)	2.33 (0.61)	2.37(0.71)
ApoB, g/L	0.64(0.14)	0.62 (0.15)	0.63 (0.17)	0.69(0.16)	0.65 (0.16)	0.70(0.21)
HDL-C, mmol/L	1.41(0.27)	1.27 (0.23)	1.15 (0.20)	1.36(0.23)	1.29 (0.24)	1.33(0.25)
ApoA1, g/L	1.26(0.18)	1.17 (0.16)	1.09 (0.14)	1.23(0.16)	1.18 (0.16)	1.23(0.18)
TGs, mmol/L	0.71(0.36)	0.87 (0.42)	0.90 (0.51)	0.84(0.42)	0.91 (0.37)	0.96(0.42)
FFA, mmol/L	0.49(0.23)	0.41 (0.20)	0.33 (0.16)	0.54(0.23)	0.42 (0.17)	0.43(0.21)
Glucose, mmol/L	5.17 0.31)	5.30 (0.36)	5.31 (0.39)	5.00(0.37)	5.18 (0.35)	5.04 0.38)
Insulin, pmol/L	29.4(21.2)	50.1 (37.4)	47.0 (36.6)	35.4(45.9)	58.5 (36.4)	51.0(25.2)
Current smoker,%	NA [b]	12.5	32.8	NA [b]	19.8	40.1
Regular alcohol intake, %	3.1	4.5	22.6	1.3	1.6	15.8

[a], Data are the mean (SD) except for smoking status and alcohol intake status, which are given as percentages.[b], NA, not asked; however, only 2.1% have ever smoked a whole cigarette.

Table 3. Means and selected percentile values for LDL peak particle size (Å) by age and sex.

	Boys			Girls		
	9 years (n = 342)	13 years (n = 371)	16 years (n = 377)	9 years (n = 369)	13 years (n = 353)	16 years (n = 437)
Percentiles (95% CI):						
5th	257.3 (256.7 – 258.2)	257.0 (256.1 – 258.4)	256.1 (254.0 – 257.1)	255.5 (254.1 – 256.8)	258.6 (256.6 – 259.3)	257.6 (257.1 – 258.4)
25th	260.8 (260.3 – 261.4)	260.3 (260.0 – 260.8)	260.1 (259.6 – 260.4)	260.5 (260.0 – 261.4)	261.3 (261.0 – 261.6)	260.8 (260.3 – 261.1)
50th	262.9 (262.6 – 263.4)	262.4 (262.1 – 262.8)	262.1 (261.7 – 262.6)	263.1 (262.8 – 263.5)	263.2 (262.9 – 263.6)	262.6 (262.3 – 263.0)
75th	265.6 (265.0 – 266.1)	264.8 (264.0 – 265.2)	264.1 (263.7 – 264.8)	265.3 (264.7 – 265.7)	265.4 (265.0 – 265.9)	264.8 (264.4 – 265.4)
95th	268.6 (267.9 – 269.5)	268.5 (267.6 – 269.5)	268.1 (267.2 – 268.8)	268.9 (267.8 – 270.4)	269.5 (268.4 – 270.3)	268.3 (267.5 – 269.0)
Means (95% CI)	263.1 (262.7 – 263.5)	262.6 (262.2 – 263.0)	262.1 (261.7 – 262.5)	262.8 (262.4 – 263.3)	263.4 (263.1 – 263.8)	262.7 (262.4 – 263.1)

Table 4. Distribution of participants with small dense LDLs (≤. 255Å) by sex, age, BMI category and IRS status.

	% with small dense LDLs (n = 2249)	
	%	*P* [a]
By sex:		
Boys	2.0	
Girls	2.1	0.813
By age:		
9-year-olds	2.2	
13-year-olds	1.0	
16-year-olds	2.8	0.085
By BMI category:		
BMI < 85th percentile	1.2	
BMI ≥ 85th percentile	6.8	< 0.001
By IRS status:		
No	0.9	
Yes	10.4	< 0.001

[a], *P*-value for comparisons between categories.

Table 5. Pearson correlations between gradient-gel electrophoresis measurements of LDL peak particle size (Å) and surrogate estimates by age and sex.

Surrogate marker	Correlation [a]					
	Boys			Girls		
	9 years (n = 342)	13 years (n = 371)	16 years (n = 377)	9 years (n = 369)	13 years (n = 353)	16 years (n = 437)
LDL-C/apoB ratio, mmol/g	0.20	0.30	0.23	0.37	0.28	0.30
TC/HDL-C ratio	-0.42	-0.42	-0.47	-0.48	-0.38	-0.35
ApoB/HDL-C ratio, g/mmol	-0.36	-0.39	-0.43	-0.46	-0.36	-0.40
TG/HDL-C ratio	-0.46	-0.51	-0.50	-0.51	-0.46	-0.50
Log_e (TG/HDL-C) ratio	-0.49	-0.57	-0.55	-0.55	-0.47	-0.50

[a], All *p*-values for correlations are < 0.001.

Table 6. **Pearson correlations between LDL peak particle size (Å) and other metabolic risk factors by age and sex.**

Metabolic risk factors	*Correlation*					
	Boys			Girls		
	9 years (n = 342)	13 years (n = 371)	16 years (n = 377)	9 years (n = 369)	13 years (n = 353)	16 years (n = 437)
TC, mmol/L	0.06	-0.01	-0.12 [e]	-0.09	-0.01	-0.11 [e]
LDL-C, mmol/L	-0.02	-0.02	-0.12 [e]	-0.12 [e]	-0.05	-0.11 [e]
ApoB, g/L	-0.14 [d]	-0.18 [c]	-0.25 [b]	-0.33 [b]	-0.20 [c]	-0.27 [b]
HDL-C, mmol/L	0.44 [b]	0.44 [b]	0.46 [b]	0.47 [b]	0.40 [b]	0.29 [b]
ApoA1, g/L	0.29 [b]	0.19 [c]	0.27 [b]	0.26 [b]	0.26 [b]	0.05
TG [a], mmol/L	-0.41 [b]	-0.50 [b]	-0.46 [b]	-0.47 [b]	-0.39 [b]	-0.45 [b]
FFA [a], mmol/L	< 0.01	0.08	-0.13 [e]	< 0.01	-0.04	0.02
Glucose, mmol/L	< 0.01	0.08	0.04	-0.07	0.06	0.09
Insulin [a], pmol/L	-0.12 [e]	-0.15 [d]	-0.11 [e]	-0.20 [b]	-0.08	-0.02
BMI [a], kg/m^2	-0.19 [c]	-0.21 [b]	-0.17 [d]	-0.21 [b]	-0.08	-0.04

[a], Variables were $\log_e$-transformed for statistical analyses.[b], *P*-value ≤ 0.0001.
[c], *P*-value ≤ 0.001.[d], *P*-value ≤ 0.01.[e], *P*-value ≤ 0.05.

Table 7. Multiple mixed regression analysis showing the independent associations between LDL peak particle size (Å), and other metabolic risk factors, age and sex.

Independent variable	β	SE	*P*
Z-score for apoB (1 SD) [a]	-0.22	0.07	0.002
Z-score for HDL-C (1 SD) [a]	1.10	0.07	< 0.001
Z-score for TG (1 SD) [a]	-1.21	0.08	< 0.001
Z-score for insulin (1 SD) [a]	0.26	0.07	< 0.001
Z-score for BMI (1 SD) [a]	0.02	0.07	0.810
Age:			
16-year-old [b]	-0.57	0.22	0.009
13-year-old [b]	0.03	0.20	0.893
Sex: girls [c]	0.39	0.12	0.001

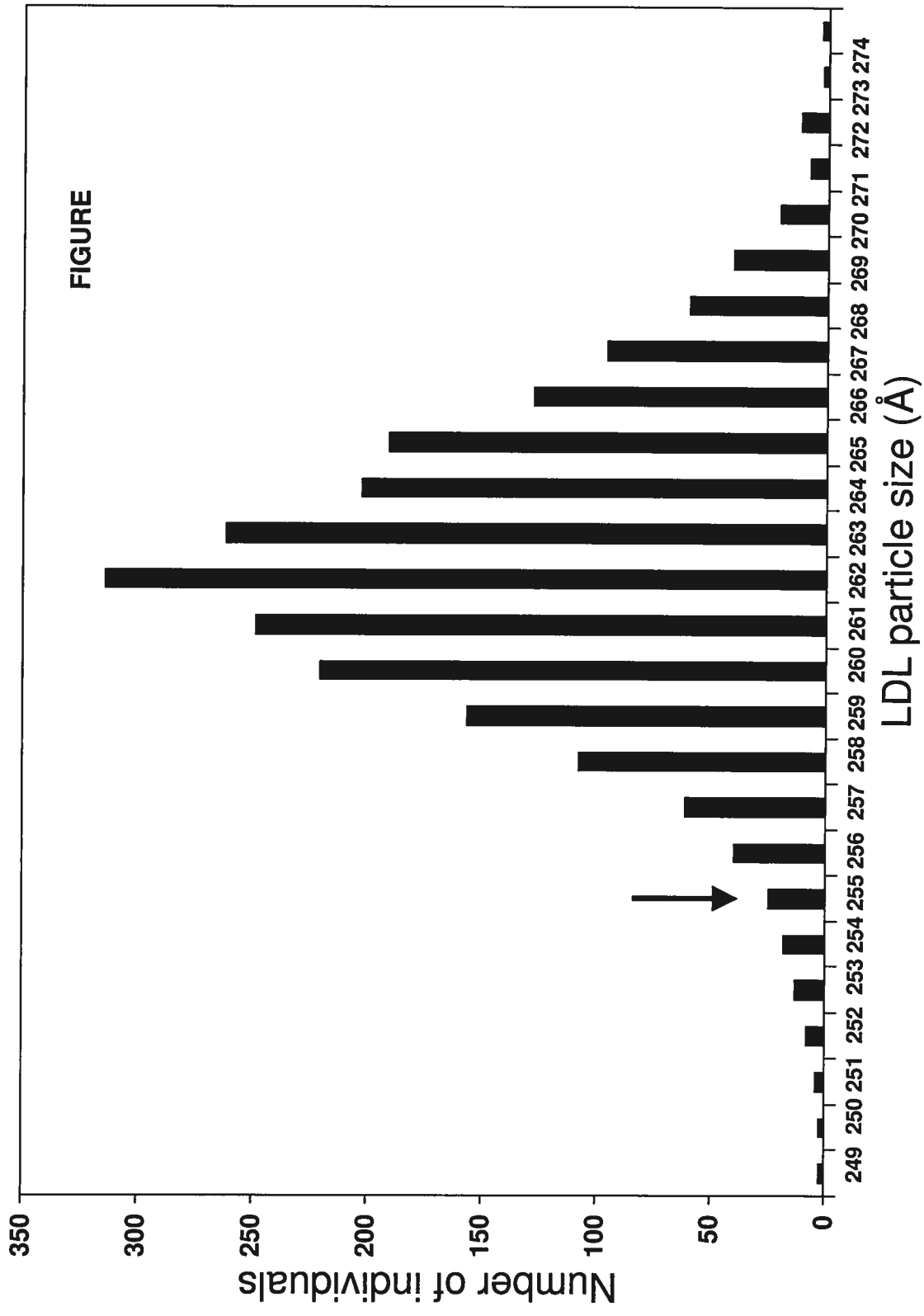
β indicates regression coefficient, SE, standard error and *P*, probability value for the regression coefficient.

[a], Regression coefficients (β) represent the change in mean LDL peak particle size per unit (1 SD) increase in Z-scores for apoB or HDL-C or TG or insulin or BMI, after adjustment for all the other variables in the model.

[b], Regression coefficients (β) represent the change in mean LDL particle size for the 16-year-olds or 13-year-olds compared with the 9-year-old reference group, after adjustment for all the other variables in the model.

[c], Regression coefficient (β) represents the change in mean LDL particle size for females compared with the male reference group, after adjustment for all the other variables in the model.

FIGURE


Number of individuals
0
50
100
150
200
250
300
350
249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274
LDL particle size (Å)

Sixième article

EFFECT OF HUMAN RECOMBINANT LEPTIN ON LIPID HANDLING BY FULLY DIFFERENTIATED CACO-2 CELLS

Pour cet article, j'ai réalisé l'ensemble des expériences en me basant sur des techniques bien établies et couramment utilisées dans notre laboratoire et grandement contribué à la rédaction en collaborant avec les Dr Edgard Delvin et Dr Emile Levy.

FEBS Lett, 2001, 508(1), 80-4

Effect of human recombinant leptin on lipid handling by fully differentiated Caco-2 cells.

[1]Stan S, [1,2]Levy E, [3]Bendayan M, [1]Zoltowska M, [1,4]Lambert M, [1,4]Michaud J, [5]Asselin C, [1,6]Delvin EE.

[1]Centre de recherche, Hôpital Ste-Justine, Départements. de [2]Nutrition, de [3]Pathologie et Biologie cellulaire, de [4]Pédiatrie et de [6]Biochimie, Université de Montréal, [5]Département. d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke, Québec.

Short title: leptin and lipid metabolism by Caco-2 cells

Correspondance to: Dr. Edgard E. Delvin,
Centre de recherche, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal QC, H3T 1C5, Canada,
Tel:514-345-4690
Fax: 514-345-4803, [redacted]

Keywords: Leptin, Leptin receptor, Lipid, Lipoprotein, immunohistochemistry, protein A-gold

ABSTRACT

It has been established that leptin displays a number of effects on peripheral tissues. We have investigated the effect of the hormone on lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein secretion in Caco-2 cells. Immunocytochemistry revealed the presence of leptin receptors (Ob-Rb) on the basolateral membrane. Incubation of cells with 200 nM leptin resulted in a decreased export of triglycerides in the basolateral medium without affecting monoglyceride, diglyceride and cholesterol ester lipid classes. It also significantly reduced the output of *de novo* synthesized apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48 as well as that of newly formed chylomicrons and of low density lipoproteins. It also enhanced that of ApoA-1, ApoA-IV and ApoE. Our results support the hypothesis that leptin can affect energy balance at the gut level by reducing lipid release into the circulation.

1. INTRODUCTION

The lipid content of the diet has considerably increased over the past century and has contributed to the epidemics of obesity in Western countries, as most clearly illustrated in populations that have experienced a sudden change in dietary habits, such as Pima Indians, and the Australian Aborigines

(1, 2). Due to the high caloric value of fat nutrients and the relative efficiency of intestinal handling, fat absorption and postprandial lipemia have become a major focus of obesity research.

It is generally accepted that leptin, a peptide hormone discovered in 1994 by Zhang *et al.* (3) controls appetite and increases energy expenditure at the hypothalamic level. In humans, its concentrations generally correlate positively with obesity (4-6). Its importance in human physiology has further been exemplified in patients with multiple endocrine defects and immune dysfunction in whom a missense mutation of the leptin gene caused its deficiency (7). However, in the vast majority of obese human subjects elevated leptin concentrations are observed, indicating a leptin resistant state rather than leptin deficiency (8, 9).

In recent years, it has clearly been established that leptin, besides its central role at the hypothalamic level, displays a number of effects on a variety of cells and peripheral tissues. For example, leptin inhibits basal insulin secretion and glucose-stimulated insulin secretion in normal and ob/ob mice (10). Furthermore, leptin shows a diuretic action in hydrated rodents, probably through specific receptors localized in the internal kidney medulla (11). On the other hand, its acute administration has been reported to decrease white adipose tissue lipogenesis and increase fat mobilization (12). Furthermore, although acute treatment of ob/ob mice with recombinant leptin rapidly caused a stimulation of liver long-chain fatty acid synthesis, chronic treatment diminished the *de novo* fatty acid synthesis (13), thereby impacting on lipoprotein synthesis. Accordingly, other *in vivo* experiments using ob/ob

mice have shown impaired liver HDL-apolipoprotein which can be reversed by low-dose leptin treatment (14). Similarly, disturbances occur in ob/ob mouse hepatocytes HDL-lipoprotein binding, degradation and secretion processing which can be corrected by leptin (15).

Closer to the present report, it is interesting to note that the baseline leptin level could be predicted from body mass index (BMI) and circulating apolipoprotein A-I (apoA-I) concentration in obese children (16). Surprisingly, the influence of leptin on the elaboration of apolipoproteins and of high-density lipoproteins (HDL) by the intestine, an organ contributing 50% of total circulating lipids and lipoproteins, has not been investigated. Morton *et al.* (17) have reported the presence of functional leptin receptors in the mouse jejunum and in differentiated Caco-2 cells. They have also shown that intravenous leptin administration, 15 minutes before a fat load, paradoxically reduced jejunal apolipoprotein A-IV (apoA-IV) transcript levels. Aside from these data and, the recent report of Doi *et al.* (18), who also reported that the simultaneous intravenous administration of leptin and duodenal lipid load attenuated the increase of cellular apoA-IV content, little information is available, to our knowledge, on the role of leptin in intestinal lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein secretion.

In the present report we have investigated the effect of human recombinant leptin (hrLeptin) on lipid handling in fully differentiated Caco-2 cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell culture

Caco-2 cells obtained from the ATCC (Bethesda, MD, USA) were grown at 37^0C with 5% CO_2 in minimum essential medium (MEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) in 175 cm^2 plastic flasks (Corning, NY) as described in detail previously (19, 20). The medium contained 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids (Gibco-BRL) and was supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS; Flow McLean, VA). Cultures (passages 30-40) were split (1:3 to 1:6) upon reaching 70-90% confluency, using 0.05% trypsin-EDTA (0.5mM, Gibco-BRL).

For individual experiments, cells were plated at a density of 1 X 10^6 cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4-µm pores (Costar, Cambridge, MA, USA), in MEM (as above) supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper (apical) and lower (basolateral) compartments of the monolayers. Cells were cultured for 20 days, at which time Caco-2 cells were highly differentiated (21). For a more efficient induction of lipid, lipoprotein and apolipoprotein synthesis, cells were incubated in presence of unlabeled oleic acid, bound to albumin, in a serum-free medium, for 20 hours, prior to the experiments. Transepithelial resistance, an index of confluence and tight junction integrity, was determined using a Millicel-ERS apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA) (22).

2.2 Effect of Leptin on the *de novo* lipid synthesis

Radiolabeled [^{14}C]-oleic acid (Amersham, Oakville, Ontario, Canada) was added to unlabeled oleic acid and solubilized in fatty acid free-bovine serum albumin (23, 24). The final oleic acid concentration was 1 μmol/well with 0.45 μCi of [^{14}C]-oleic acid attached to albumin. 200 nM hrLeptin in 5% FBS supplemented MEM (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), concentration at which maximal effects were observed by Morton *et al.* (17) in the same model, was then added to the basolateral compartment. Cells were incubated for a period of 8 hours at 37^{0}C, in the presence of [^{14}C] oleic acid-containing medium added to the apical compartment. At the end of the incubation period, the basolateral medium was collected and the cells were scraped in cell lysis buffer as described previously (20). After the addition of anti-proteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, leupeptin and trasylol), the lipids contained in the cell lysates and medium were extracted by standard methods (23-25) in presence of unlabeled carrier phospholipids (PLs), monoglycerides (MGs), diglycerides (DGs), triglycerides (TGs) free fatty acids (FFAs) and chlolesteryl ester (CE).

The various lipid classes were separated by thin layer chromatography (TLC) using a ternary solvent system consisting of hexane/ether/acetic acid (80:20:3, v/v/v) as previously described (26). The area corresponding to each lipid standard, run simultaneously, was scraped off the TLC plates, placed in a vial with Ready Safe® counting fluid (Beckman, Montréal, QC, Canada) and counted on a scintillation counter (Beckman LS 5000 TD) to determine its

radioactivity content. Proteins were measured by the method of Lowry *et al.* (27) using bovine serum albumin as standard. Results were reported as disintegration per minute/mg protein.

2.3 Effect of Leptin on the *De Novo* Apolipoprotein synthesis

As previously mentioned, cells were incubated in presence of non labeled oleic acid (1μM) attached to albumin to stimulate apolipoprotein synthesis. After 20 h, cells were carefully washed with methionine-free MEM and incubated for 3 hours in the presence of [^{35}S]-methionine (150 μCi/well, 50mCi/mmol, Amersham, Oakville, Canada). At the end of the labeling period, the medium of the basolateral compartment was collected and cells scraped in a lysis buffer. Aliquots of cell homogenates and basolateral medium were precipitated with 5% trichloracetic acid (TCA). The precipitates were washed three times with 5% TCA before counting the radioactivity on a Beckman liquid scintillation spectrometer. Other centrifuged aliquots were reacted with excess monoclonal antibodies directed against ApoA-1, Apo-IV, ApoB and ApoE for 18h at 4^{0}C. Following the addition of Pansorbin (Calbiochem, San Diego, CA, USA), the mixture was incubated at 20^{0}C for 60 min and the immunoprecipitate extensively washed before being submitted to gradient (4-15%) polyacrylamide electrophoresis as already described (28-30). Gels were sectioned into 4mm slices and counted after overnight incubation at 20^{0}C with 1ml of BTS-450 (Beckman) and 10 ml of Ready Solve® liquid scintillation fluid.

2.4 Effect of Leptin on the *De Novo* Lipoprotein synthesis

For the determination of the newly synthesized and secreted lipoproteins, cells were incubated for a prolonged period of 20h in presence of 200nM hrLeptin and 1.0 μmol/well of unlabeled oleic acid containing 0.9 μCi of [^{14}C] oleic acid so as to detect an appreciable amount of lipoproteins secreted into the basolateral medium. At the end of the incubation period, the basolateral medium was collected and supplemented with protease inhibitors and a plasma carrier in the ratio (2.0/0.6: vol/vol) (31). Lipoproteins were then isolated by sequential ultra-centrifugation using a TL-100 Beckman ultracentrifuge as per our described method (23). Each lipoprotein fraction was exhaustively dialysed against 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.0 at 4^{0}C for 24 h before being counted.

2.5 Immunocytochemistry

The antibody against the leptin receptor (Ob-Rb) was purchased from R&D Systems Inc. This rabbit polyclonal IgG [(Ob-R (H-300)] is directed against the epitope corresponding to amino acids 541-840 mapping within a cytoplasmic domain of the human Ob-Rb (32). Confluent cells were fixed in situ with 1% glutaraldehyde and processed for embedding in Lowicryl at -20^{0}C as described previously (33). Thin sections were mounted on Parlodion and carbon-coated nickel grids and processed for immunocytochemistry using the immunogold approach (33). In short, the sections were incubated overnight at 4^{0}C with the anti-Ob-Rb antibody diluted 1:20. The sections were

then rinsed with 0.01M phosphate buffered saline and incubated with the protein A-gold complex for 1 h at room temperature. The protein A-gold complex was prepared with 10nm gold particles according to the previously reported protocols (33). Control experiments were performed to assess the specificity of the labeling. The sections were incubated with a normal serum followed by protein A-gold or with protein A-gold alone omitting the first antibody. For the quantitative evaluations, the plasma membrane profiles of 25 cells were recorded and printed to a final magnification of X 50 000. The density of labeling present over the apical and basolateral membranes was evaluated by measuring the length of the membranes and the number of particles being aligned on such membranes (33). The results are expressed as the number of gold particles per length (μm).

2.6 Statistical analysis

Conventional methods were used for calculation of means and standard error. Statistical significance for differences in variables between control and hrLeptin treated cells was assessed with the Student *t*-test.

3. RESULTS

In order to reveal the distribution of leptin receptors, sections of Caco-2 cells were exposed to the anti Ob-Rb antibody followed by the protein A-gold complex. The gold particles were particularly present at the level of the basolateral membrane (Fig. 1B), while only few particles localized over the apical membrane (Fig. 1A). Furthermore, specific labeling appeared to be

absent, with only few particles distributed in the cytoplasm, mitochondria and nuclei. Quantitative evaluations confirmed the presence of a specific higher labeling at the basolateral membrane (Table 1). The absence of labeling with protein A-gold in the absence of the primary antibody, confirmed the specificity of our immunocytochemical method (Table 1).

As shown in Table 2, incubation of fully differentiated Caco-2 cells with 200 nM hrLeptin on the basolateral side for 8 hours did not affect cell content of any of the *de novo* synthesized lipid fractions. It resulted, however, in a decreased export of TG (68 ± 15 %, $p< 0.01$) in the basolateral medium, compared to controls without affecting monoglyceride (MG), diglyceride (DG) and cholesterol ester (CE) lipid classes.

Figures 2 (A and B) illustrate the effects of hrleptin on the *de novo* synthesis of apolipoproteins assessed after a 3-hr incubation with ^{35}S-methionine as a tracer. Under these conditions, hrLeptin significantly reduced the cell content of *de novo* synthesized apoB-100 and apoB-48 by 32% ($p<0.05$) and 22% ($p<0.01$) respectively (figure 2A). Similarly, the presence of the hormone diminished the output apoB-100 and of apoB-48 by 33% ($p<0.01$) and 40% ($p<0.05$) respectively in the basolateral medium (figure 2B). Besides, ApoA-1, ApoA-IV and ApoE *de novo* synthesis and secretion were substantially enhanced. Of particular note was the induction of apoA-IV (400%, $p<0.01$)

Lipoprotein production was assessed by following the [^{14}C]-oleic acid incorporation into the different density fractions collected by ultracentrifugation: 0.95 (Chylomicrons, CM), 1.006 (Very low density

lipoproteins, VLDL), 1.063 (Low density lipoproteins LDL) and 1.21 g/ml (High density lipoproteins, HDL) As shown in table 3, hrLeptin inhibited the secretion of CM (89 ± 9 %, $p<0.03$) and of LDL (78 ± 18, $p<0.05$). VLDL and HDL remained unaffected.

Of interest, when cells were incubated in presence of rhLeptin on the apical side, at the same concentration, no effects were observed on lipid esterification, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein assembly (data not shown).

4. DISCUSSION

Leptin, a cytokine-like peptide known to regulate food intake at the hypothalamus level (34), exerts its effect through the activation of the Janus kinase signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling cascade (17, 35). Although Ob-Rb distribution was originally described in the hypothalamus, its expression has subsequently been observed in peripheral tissues as diverse as pancreatic islets (10), hematopoietic stem cells and, more recently in the stomach (36, 37). Morton *et al.* (17) have shown, by RT-PCR, that Ob-Rb was expressed in Caco-2 cells and that leptin, at concentrations similar to ours, caused the induction of immediate-early genes and activation of STAT3 and STAT5. They did not however address its specific function in intestinal lipid metabolism.

In the present report, using established immunohistochemical methods, we demonstrate that the leptin receptor (Ob-Rb) is specifically located on the basolateral membrane of fully differentiated Caco-2 cells

(Figure 1B and Table 1). We also show that leptin inhibits the TG secretion (Table 2), the biosynthesis of apoB-100 and apoB-48 (Figure 2A) as well as the output of CM and LDL (Table 3). Although the concentration of leptin used is high, it may be that the concentration in the receptor microenvironment is much less due either to a low diffusion of the peptide, its degradation with time or adsorption on plastic dish. However, the fact that the effects are observed only when the cytokine is present in the basolateral medium militates in favor of a specific action. Furthermore, other studies performed in our laboratory revealed that neither of two other cytokines, TGFβ or IFNγ, affected lipid metabolism (unpublished results).

Intestinal epithelial cells have the unique ability to elaborate CMs, the major vehicle for the transport of dietary fat (38). In our investigation, we document the influence of leptin on the sequential events leading to the lipid output into the basolateral compartment. We show that the administration of the hormone, at the same concentration (200nM) as that used by Morton *et al.* (17), results in the decrease of TG secretion without affecting cell content, pointing to a lack of hormonal effect on the esterification process. The concomitant diminution of chylomicron and LDL delivery to the basolateral compartment indicates, on its part, that the lipoprotein assembly process is the target of leptin action. This hypothesis is supported by the reduction of *de novo*-synthesized apoB cell content and presence in the basolateral medium. These data, in turn, hint to ApoB being the limiting factor for CM delivery. Various reports have indeed demonstrated that the post-translational

translocation of the apolipoprotein across the ER membrane is the rate-limiting step in apoB-containing lipoprotein formation (21,39).

The endoplasmic reticulum MTP/PDI heterodimer is crucial for the lipidation and protection of ApoB from proteolysis as well as for the enrichment of lipoprotein particles with triglycerides (40). In view of our data documenting a lack of effect of hrleptin on MTP activity (data not shown), we suggest that this protein complex is not implicated in the modulation of lipoprotein assembly and exocytosis. These results are similar to those of Macri et al. (41) who have recently shown, in HepG2 cells, that inhibition of MTP did not affect the translocation of ApoB but facilitated its proteasome-mediated degradation, thereby impacting on the assembly and secretion of apoB-lipoprotein particles. Therefore, additional investigation is required to understand the mechanisms by which leptin affects lipoprotein metabolism in Caco-2 cells.

Data on the direct effect of leptin on enterocyte apolipoprotein synthesis are scarce. Two reports address the effect of leptin on enterocyte apolipoprotein synthesis in *in vivo* models. In the first one (17), the authors have shown that an intravenous injection of leptin, 90 minutes after a fat load, caused a 2-fold reduction in apoA-IV transcript levels in the jejunum of leptin-deficient mice (ob/ob). In the second, Doi *et al.* (18) have recently reported a rapid (4 hours) increase in apoA-IV immunoreactivity in rat jejunum and ileum following an intra-duodenal lipid infusion. This stimulatory effect was however paradoxically attenuated by a simultaneous leptin infusion. We show that, in Caco-2 cells fully differentiated as enterocytes, ApoA-I, A-IV and ApoE

biosynthesis and secretion were enhanced by leptin (Fig 2). In terms of apoA-IV, the variance of our results with the aforementioned reports could be due to the model used and the different experimental conditions.

Our results indicate that leptin has a role in the absorptive and metabolic functions of the enterocyte and could possibly play an early role in limiting fat absorption. It could be conceived that disruption of the leptin signaling pathway is acquired in the obese state, leading to an impaired control of intestinal lipid synthesis and export. This "resistance" state could then possibly lead to a more important and prolonged post-prandial lipid load. Our results also support the hypothesis that leptin can affect energy balance through mechanisms prior to and possibly independent of those described at the hypothalamic level.

Aknowledgements: Funded in part by l'Association Diabète Québec (EED) and the Canadian Heart and Stroke Foundation (EL).

The authors wish to thank Ms Carole Garofalo and Louise Thibault for their invaluable technical support.

5. BIBLIOGRAPHY

1. Swinbur BA, Boyce VL, Bergman RN *et al.* (1991) J Clin Endocrinol Metab 73: 156-165.

2. O'Dea K, Traianedes K, Hopper JL *et al.* (1988) Diabetes Care 11: 23-29.

3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M *et al.* (1994) Nature 372: 425-432.

4. Hallas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Science 269: 543-546.

5. Maffei M, Halaas J, Ravussin E *et al.* (1995) Nat Med 1; 1155-1161.

6. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML *et al.* (1996) N Engl J Med 334: 292-295.

7. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J (1999) J Clin endocrinol Metab 84: 3686-3695.

8. Frederich RC, Hamann A, Anderson S *et al.* (1995) Nat Med 1: 1311-1314.

9. Considine RV, Considine EL , Williams CJ *et al.* (1995) J Clin Invest 95: 2986-2988.

10. Emilsson V, Liu Y-L, Cawthorne MA, Morton NM,, Davenport M (1997) Diabetes 46: 313-316.

11. Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Brossard G, Pouzet B, Marty E, Maffrand JP, Le Fur G (1997) FEBS lett 404: 185-191.

12. Bryson JM, Phuyal JL, Swan V *et al.* (1999) Am J Physiol 277: E417-E422.

13. Cohen SM, Werrmann JG, Tota MR (1998). Proc Natl Acad Sci (USA) 95: 7385-7390.

14. Silver DL, Jiang XC, Tall AR (1999) J Biol Chem 274: 4140-4146.

15. Silver DL, Wang N, Tall AR (2000) J Clin Ivest 105: 151-159.

16. Holub M, Zwiauer K, Winkler C *et al.* (1999) Int J Obes Relat Metab 23: 60-66.

17. Morton NM, Emilsson V, Liu YL, *et al.* (1998) J Biol Chem 273: 26194-26201.

18. Doi T, Liu M, Seeley RJ, Woods SC, Tso P (2001) Am J physiol 281: R753-R759.

19. Levy E, Mehran M, Seidman E (1995) FASEB J 9: 626-635.

20. Mehran M, Seidman E, Marchand R, Gurbindo C, Levy E (1995) Am J Physiol 269:G953-G960.

21. Mehran M, Levy E, Bendayan M, Seidman E (1997) In Vitro Cell Dev Biol Anim 33: 118-128.

22. Spalinger JH, Seidman EG, Ménard D. Levy E (1998) Biochim Biophys Acta 1393: 119-127.

23. Levy E, Thibault L, Ménard D (1992) J Lipid Res 33: 1607-1617.

24. Loirdighi N, Ménard D, Delvin E, Levy E (1997) J Cell Chem 66: 65-76.

25. Levy E, Yotow W, Seidman EG, Garofalo C, Delvin E, Ménard D (1999) Biochim Biophys acta 1439: 353-362.

26. Levy E, Loirdighi N, Thibault L, Nguyen TD, Labuda D, Delvin E, Ménard D (1996) Am J Physiol 270: G813-G820.

27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J Biol Chem 265-275.

28. Lévy E, Thibault L, Delvin E, Ménard D (1994) Biochem Biophys Res Commun 204: 1340-1345.

29. Levy E, Rochette C, Londono I, Roy CC, Milne RW, Marcel YL, Bendayan M (1990) J Lipid Res 31: 1937-1946.

30. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, Bendayan M, Roy CC (1987) J Lipid Res 28: 1263-1274.

31. Levy E, Beaulieu JF, Delvin E, Seidman E, Yotow W, Basque JR, Ménard D (2000) J Lipid Res 41: 12-22.

32. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J Devos R, et al. Cell (1995) 83: 1263-1271.

33. Bendayan M (1995) Prog Histochem Cytochem 29: 1-159.

34. Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, Flier JS, Saper CB (1997) Endocrinology 138: 839-842.

35. Hübschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S, Meyerhof W (2001) J Neurosci 21: 2413-2424.

36. Cioffi JA, Shafer AW, Zupanic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail AA, Platika D, Snodgrass HR (1996) Nat Med 2: 585-589.

37. Mix H, Wigjaja A, Jandl O, Cornberg M, Kaul A, Göke M *et al.* (2000) Gut 47: 481-486.

38. Lévy E in: Digestion and absorption of carbohydrates, fat and proteins in small bowel disorders. RN Ratnaike (ed.) Oxford University Press, NY, NY. 2000 pp 162-189.

39. Hussain MM, Kedees MH, Singh K, Athar H, Jamali NZ (2001) Front Biosci 6: D320-331.

40. Shelness GS, Sellers JA (2001) Curr opin Lipidol 12: 151-157.

41. Macri J, Kazemian P, Kulinski A, Rudy D, Aiton A, Thibert RJ et al. (2000) Biochem Biophys Res Commun 276: 1035-1047.

Legends

Figure 1: Protein A-gold labeling of differentiated Caco-2 cells for the specific functional leptin receptor Ob-Rb.

Confluent cells were fixed in situ with 1% glutaraldehyde, processed for embedding in Lowicryl at -20^{0}C and processed by the immunogold to reveal the Ob-Rb receptor. The labeling by colloidal gold particles is present along the basolateral membrane (blm) of the Caco-2 cells while the apical membrane lining the microvilli (mv) is devoid of labeling.

Figure 2: Effect of hrLeptin on cellular content (A) and on basolateral secretion (B) of *de novo* synthesized apolipoproteins in fully differentiated Caco-2 cells.

Cells were incubated with 200 nM hrLeptin for 3 hours in presence of [^{35}S] methionine and apolipoproteins were analyzed as described in the Materials and Methods section. The results are the means ± SEM of 6 control and 6-10 leptin-treated cell incubations. Mean values for the control experiments, expressed as dpm/mg proteins for each apolipoprotein in the cell compartment were: ApoB-100: 16596; ApoB-48: 9847; ApoA-1: 3843; ApoA-IV: 16078 and ApoE: 7209. In the basaolateral medium, the values were: ApoB-100: 19125, ApoB-48: 9748, ApoA-1: 335, ApoA-IV: 437 and ApoE: 838. The significance of the difference between the treated and control cells was assessed by Student's *t*-test. *$p < 0.01$; **$p < 0.05$.

Figure 1

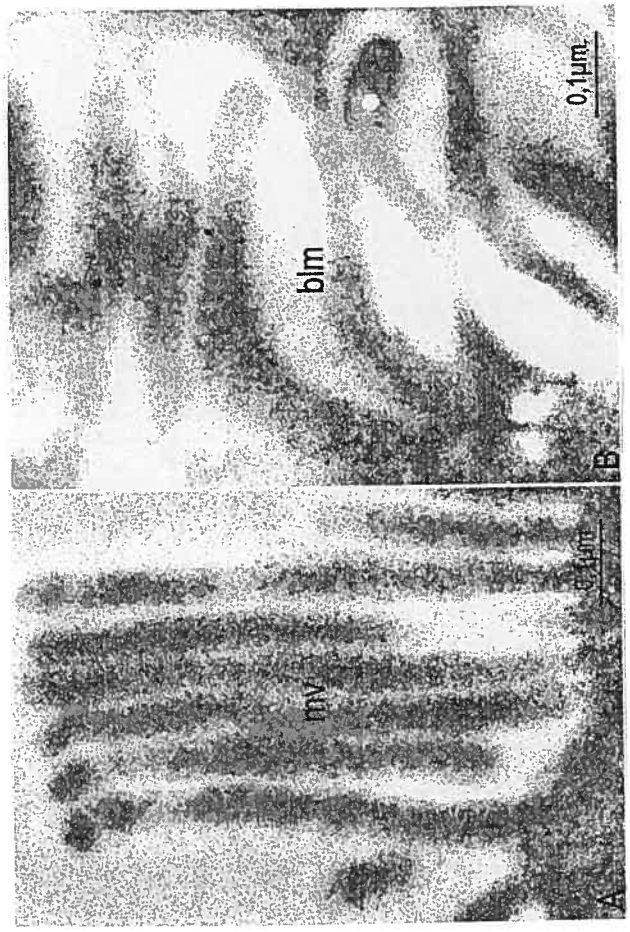
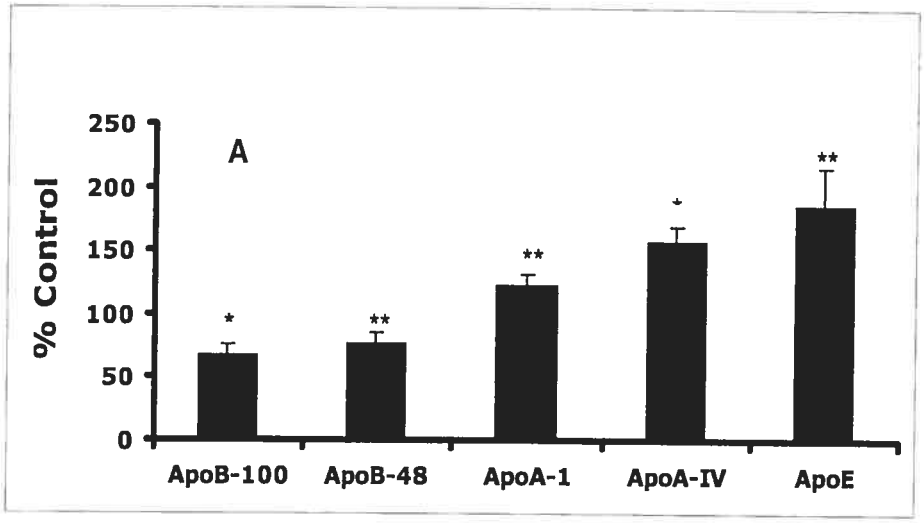


Figure 2

A)


A
% Control
250
200
150
100
50
0
*
**
**
*
**
ApoB-100
ApoB-48
ApoA-1
ApoA-IV
ApoE

B)

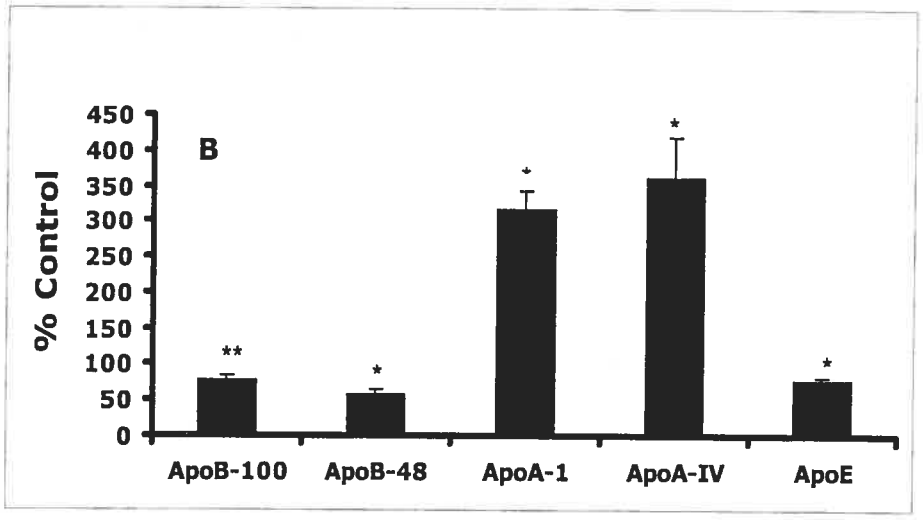

B
% Control
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
**
*
*
*
*
ApoB-100
ApoB-48
ApoA-1
ApoA-IV
ApoE

Table 1: Density of labeling for Ob-Rb in plasma membranes of confluent and differentiated Caco-2 cells

Caco-2 cell Plasma Membrane Domains	Anti-OB-Rb/pA-gold	pA-gold
Apical Membrane	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Basolateral Membrane	0.60 ± 0.10*	0.05 ± 0.01

Units are: number of gold particles/ μm of membrane Confluent cells were fixed in situ with 1% glutaraldehyde and processed for embedding in Lowicryl at -20^{0}C. Thin sections were mounted on Parlodion and carbon-coated nickel grids and processed for immunocytochemistry using the immunogold approach as described in the Materials and Methods section. For the quantitative evaluations, the plasma membrane profiles of 25 cells were recorded and printed to a final magnification of X 50 000. The density of labeling present over the apical and basolateral membranes was evaluated by measuring the length of the membranes and the number of particles being aligned on such membranes. The results are expressed as the number of gold particles per length (μm).

The significance of the difference in gold particle density between the basolateral and apical membranes was assessed by the Student *t*-test for unpaired variates. *$p<0.01$

Table 2: Effect of hrLeptin on lipid synthesis by confluent and differentiated Caco-2 cells.

Compartment	MG	DG	TG	CE	Total
Cells					
C	61658 ± 2213	1861 ± 99	186793 ± 6340	2072 ± 171	253193 ± 4267
T	62922 ± 1484	1899 ± 67	194297 ± 6597	2078 ± 120	261938 ± 6953
% Control	102 ± 2.4	103 ± 5	103 ± 2.5	100 ± 3.2	103 ± 2.3
BL Medium					
C	936 ± 158	161 ± 24	10645 ± 1330	164 ± 37	12828 ± 1806
T	791 ± 102	141 ± 12	8045 ± 787*	127 ± 21	10305 ± 1153
% Control	86 ± 8.1	90 ± 7.8	68 ± 6.8*	85 ± 7.9	82 ± 8.1

Cells were incubated with 200 nM hrLeptin for 8 hours and lipids were analyzed as described in the Materials and Methods section. Cells: Intracellular content; BL Medium: Basolateral medium content; C: Control cells (n=3); T: hrLeptin treated cells (n=6). MG: monoglycerides. DG: diglycerides, TG: triglycerides, CE: cholesterol esters. Values are expressed as dpm/mg protein and as means ± SEM. The significance of the difference between the treated and control cells was assessed by Student's *t*-test. *$p < 0.01$;

Table 3: Effect of hrLeptin on lipoprotein secretion in the basolateral medium by confluent and differentiated Caco-2 cells.

	CM	VLDL	LDL	HDL
C	40595 ± 6053	51043 ± 14398	9230 ± 1996	4952 ± 1031
T	33236 ± 3590**	44305 ± 7511	7064 ± 1086**	5440 ± 579
% Control	89 ± 3.9 **	114.5 ± 5.7	78 ± 7.4 **	99 ± 3.7

Cells were incubated with 200 nM hrLeptin for 20 hours and lipoproteins were analyzed as described in the Materials and Methods section. C: Control cells (n=3); T: hrLeptin treated cells (n=6).

Values are expressed as dpm/mg protein and as means ± SEM. CM: chylomicrons, VLDL: very low density lipoproteins, LDL: low density lipoproteins, HDL: high density lipoproteins. The significance of the difference between the treated and control cells was assessed by Student's *t*-test. **$p < 0.05$.

DISCUSSION

L'intestin, longtemps considéré comme un organe passif par son rôle dans la digestion et l'absorption de nutriments a connu, grâce aux efforts investis, de nouvelles qualifications témoignant non seulement de son implication active dans le transport et le métabolisme de plusieurs nutriments et composés chimiques et dans la synthèse lipoprotéinique, mais aussi de son rôle régulatoire tant au niveau nutritionnel qu'au niveau hormonal, génique, développemental et pharmacologique.

Le projet présenté dans le cadre de cette thèse de doctorat situe l'intestin dans un contexte d'obésité, de résistance a l'insuline et d'altération du métabolisme lipidique et démontre sa contribution au syndrome de résistance à l'insuline à travers des évènements intra-entérocytaires, mais également par son interaction avec des éléments plasmatiques.

L'intestin et le foie possèdent tous deux les éléments indispensables à la synthèse et la sécrétion de lipoprotéines, mais les processus métaboliques sous-jacents diffèrent sur plusieurs aspects. Malgré ces distinctions, ces deux organes possèdent en égale mesure deux partenaires absolument essentiels à la synthèse lipoprotéinique: le FABP et le MTP.

La famille des FABP est constituée de plus de 15 protéines responsables de la captation et du transport cytosolique des acides gras, de la modulation du métabolisme intracellulaire des lipides et de la régulation de l'expression de plusieurs gènes. Les FABP affichent une distribution tissulaire spécifique (143). Tandis que l'intestin exprime deux FABP : I-FABP (ou FABP intestinale) et L-FABP (ou FABP hépatique), le foie ne contient que la L-

FABP. Dans l'intestin, la localisation de ces deux transporteurs est similaire : les deux abondent dans la partie proximale de l'intestin, portion où l'absorption est maximale, et dans le cytoplasme des cellules villositaires (141). Toutefois, ces deux isoformes diffèrent dans leur spécificité de liaison aux acides gras. La I-FABP s'attache de façon étroite et spécifique aux acides gras, alors que la L-FABP, qui possède la capacité de s'associer à deux ligands simultanément, fait preuve d'une affinité et d'une association plus faibles et très variables envers les acides gras (143, 541). En effet, la L-FABP se lie également à d'autres composés tels que la lysophosphatidylcholine, les dérivés CoA des acides gras, les rétinoïdes, la bilirubine et certains carcinogènes et anticoagulants, ce qui affaiblit sa relation avec les acides gras. Par conséquent, on attribue au I-FABP le rôle de transporteur principal des acides gras dans l'entérocyte, à partir des microvillosités jusqu'au RE où aura lieu la formation de particules lipoprotéiniques. On suggère que la L-FABP, de son côté, contribue au cheminement des ligands vers différentes destinations intracellulaires comme le noyau et la membrane plasmique ou les sites enzymatiques en vue d'une régulation génique et la protection de la membrane (141, 143, 542-544).

Une fois les acides gras transportés vers le RE par les FABP, ils sont réesterifiés en TG, PL et cholestérol ester, qui seront assemblés en lipoprotéines. L'assemblage des chylomicrons dans l'intestin et des VLDL dans le foie repose sur l'activité du MTP, une protéine présente dans le RE et dont le rôle est de transférer des lipides à la molécule d'apo B, ce qui initiera

la formation de la lipoprotéine. Sans cette lipidation, l'apo B empruntera la voie du protéasome où elle serait dégradée, ce qui compromettrait l'assemblage des particules lipoprotéiniques (146). L'activité du MTP est absolument essentielle puisqu'une mutation dans le gène du MTP conduit à l'abêtalipoprotéinémie, une pathologie caractérisée par la malabsorption des matières grasses due à l'incapacité de synthétiser des lipoprotéines (378). Étant donné l'implication de la I-FABP et du MTP dans l'assemblage des lipoprotéines, on peut comprendre que toute dysfonction au niveau de ces protéines pourrait facilement engendrer des anomalies dans le métabolisme lipidique intestinal.

Le I-FABP est le produit du gène FABP2 situé sur le long bras du chromosome 4. A ce niveau, un polymorphisme a été mis en évidence sur l'exon 2 du codon 54. Il s'agit du remplacement d'une base, soit d'une G par une A, dictant la substitution de l'acide aminé Ala par un Thr au niveau protéique. Les propriétés du variant Thr ont très peu été étudiées *in vitro*, mais on lui attribue une affinité pour les acides gras de deux fois supérieure au variant Ala (345) et une augmentation de la sécrétion de TG (346).

L'analyse structurelle de ces deux variants a permis de mieux comprendre cette étroite relation entre la I-FABP-Thr et les acides gras. La structure tridimensionnelle du I-FABP révèle une cavité formée par les hélices α et les feuillets plissés-β où aura lieu la liaison protéine-acide gras. Les acides gras parviennent au site de liaison par une région, nommée portale. Le remplacement de l'Ala par le Thr montre uniquement de légers changements dans cette région portale, ce qui expliquerait un meilleur accès

des acides gras à travers cette zone d'entrée et une liaison avec la protéine et un transport intracellulaire plus efficaces en présence de l'allèle Thr (545, 546).

Malgré des évidences que le variant Thr est associé à une élévation de l'oxydation des acides gras, à la résistance à l'insuline (345) et à une réponse post-prandiale plus prolongée suite à un repas riche en lipides chez les Indiens Pima (547), les diabétiques de type 2 (347) ou dans une population normotriglycéridemique de Finlandais (364), d'autres études n'appuient pas ces tendances, particulièrement en ce qui concerne l'implication de ce polymorphisme dans la lipémie post-prandiale (369, 374). Ces divergences sont probablement dues à des variations dans d'autres facteurs ou polymorphismes d'importantes protéines modulant le métabolisme des lipoprotéines tel que leur efficacité lipolytique et l'élimination hépatique des R-CM. Plusieurs autres polymorphismes sont connus pour leur impact modificateur du profil lipidique : Hind III du gène de la LPL (548) qui a été associé à une hypertriglycéridémie et probablement à une prédisposition pour l'obésité, Taq1B du gène de la CETP qui peut avoir un impact sur les niveaux de CETP et des HDL (549), le polymorphisme C415T de la LPL qui peut moduler les concentrations des HDL, et les polymorphismes des exons 1 et 8 ainsi que de l'intron 5 du gène du SR-BI qui ont été capables de provoquer un changement du profil lipidique (550), particulièrement chez les sujets diabétiques (551).

Puisque la capacité du polymorphisme Ala54Thr du FABP2 de moduler le transport des acides gras et la lipémie postprandiale demeure une

observation controversée, et dans le but de permettre l'investigation de l'influence du polymorphisme du I-FABP dans un environnement dépourvu de facteurs possiblement confondants, nous avons déterminé la relation entre le variant Thr et le transport intestinal des lipides, le statut des lipoprotéines et apos, et le métabolisme du glucose dans des explants intestinaux de fœtus humains qui ont été mis en culture. Ce modèle expérimental présente dès la 14 semaine de gestation des caractéristiques essentielles à l'absorption de lipides, à la synthèse de la majorité des classes de lipoprotéines et à leur sécrétion, ce qui nous a permis d'étudier le rôle fonctionnel du polymorphisme Ala54Thr du I-FABP en contournant toute interférence avec différents facteurs circulants et dans un cadre échantillonnal humain (550, 552-555).

Parmi les 32 spécimens, 22 étaient homozygotes Ala-54, 9 hétérozygotes Ala-54/Thr-54 et 1 homozygote Thr-54 avec une fréquence de l'allèle T d'environ 0.17, une valeur comparable à celles rapportées dans la littérature. Les résultats obtenus montrent une synthèse lipidique plus importante en présence de l'allèle T54, due à une estérification des TG et des PL augmentée. Conséquemment, la sécrétion des TG s'est avérée plus élevée dans ce groupe. Par contre, aucune différence dans la sécrétion des PL ou esters de cholestérol n'a été notée. En ce qui a trait aux lipoprotéines, la seule fraction démontrant une augmentation dans la sécrétion a été celle des chylomicrons, laissant les VLDL et les HDL inchangées. La biogenèse des apos diffère également selon le génotype: une synthèse et une sécrétion

plus importantes d'apo B-100 et B-48 a été enregistrée en présence de l'allèle T54, mais les niveaux d'apo A-I sont restés constants.

Pour vérifier l'hypothèse reliant le variant Thr à une surexpression des apos B, nous avons déterminé les niveaux de l'ARNm de l'apo B. Comme ils n'ont pas montré de variations selon les génotypes, on peut conclure que l'augmentation des niveaux d'apo B est probablement due à une régulation post-translationnelle. Ceci est en accord avec des concepts déjà bien connus stipulant que la synthèse de l'apo B est plutôt constitutive et que sa sécrétion est déterminée par le taux de dégradation (556, 557). Parmi les mécanismes qui préviennnent cette dégradation et qui sont à la base de l'assemblage des lipoprotéines, on trouve la lipidation de l'apo B. Dans ce contexte, trois possibilités pourraient expliquer des niveaux plus abondants d'apo B et une sécrétion plus élevée de chylomicrons. La première implique le MTP. La mesure des niveaux et de l'activité enzymatique du MTP est restée constante pour les deux génotypes du I-FABP, ce qui permettait de suggérer que la lipidation plus efficace constatée dans le cas du variant Thr soit due à une voie autre que celle du MTP. Un deuxième objectif a été de vérifier si le variant Thr était responsable d'une augmentation des concentrations cellulaires des deux FABP présentes dans l'intestin : la L-FABP et la I-FABP. En dépit de la synthèse plus accrue des TG et des chylomicrons dans le cas du variant Thr, les niveaux des deux transporteurs d'acides gras sont demeurés inchangés. À la lumière des résultats obtenus, nous avons proposé que le variant Thr est associé à un transport plus accéléré des acides gras vers le RE, contribuant à une stimulation de la réestérification

des TG et à une protection de l'apo B contre l'action des protéases. Cette troisième possibilité peut expliquer une exocytose accrue de TG, d'apo B et de chylomicrons constatée dans notre étude et reflète l'affinité plus élevée du I-FABP contenant l'allèle T54 pour les acides gras déjà rapportée dans la littérature (345). Un dernier aspect étudié dans le cadre de ce projet a été l'impact du polymorphisme Ala54Thr sur le métabolisme intestinal des glucides. Cependant, l'évaluation des activités hydrolytiques des disaccharidases présentes dans la membrane en brosse, la captation du glucose et la production de CO_2 indiquant l'oxydation du glucose ne nous ont pas permis de détecter de différences entre les deux génotypes du I-FABP.

En résumé, nos résultats démontrent que le polymorphisme T54 du FABP2 est en mesure d'influencer le métabolisme lipidique dans l'intestin humain en produisant une augmentation dans la synthèse et la sécrétion des TG, des chylomicrons et de l'apo B, événements pouvant éventuellement prédire une hyperlipidémie post-prandiale et une résistance à l'insuline.

Étant donné la grande variabilité des données concernant le rôle du polymorphisme Ala54Thr du I-FABP dans le métabolisme lipidique ou la résistance à l'insuline, une population minimalement exposée aux facteurs de risque confondants et plus homogène du point de vue génétique devrait permettre de mieux cerner l'impact de ce polymorphisme. Ainsi, l'objectif de cette partie du projet a été de vérifier si le polymorphisme Ala54Thr du I-FABP est relié à une prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline ou est en mesure de modifier l'expression de la dyslipidémie associée à ce syndrome, et ce, dans une population pédiatrique de Canadiens français.

Mis à part une exposition restreinte à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires comme l'âge, la cigarette ou l'alcool, cette population canadienne française est reconnue pour ses caractéristiques uniques, telles qu'une fréquence très élevée de mutations dans les gènes de la LPL et du récepteur LDL, responsables de l'hyperchylomicronémie et l'hypercholestérolémie familiale, respectivement, ce qui la prédispose à l'athérosclérose précoce et à d'autres pathologies lipidiques (558). Ces altérations génétiques sont associées à un effet fondateur dérivé des 8500 ancêtres colonisant la Nouvelle France au cours du 17ème siècle soumis à une croissance démographique assez rapide et dans des conditions d'isolation géographique (559).

Dans notre population, la fréquence de l'allèle muté est de 0,26, une valeur similaire à celles retrouvées dans les populations caucasienne (347), finlandaise (362) et chez les Indiens Pima (345).

Nos données révèlent que les fréquences génotypiques ou alléliques ne diffèrent pas entre les sujets présentant ou non un syndrome de résistance à l'insuline, estimé à 11,25% dans cette sous-population, et que le variant Thr n'est pas associé à une prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline. Tout comme une conclusion rapportée dans une population finlandaise (560), mais contrairement à des données recueillies au sein d'un groupe d'Indiens adultes de la Guadeloupe mettant en relation le polymorphisme Ala54Thr du I-FABP et le syndrome d'insulino-résistance (350), nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une

prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline reliée à ce polymorphisme dans la population pédiatrique Canadienne française.

Nous avons également noté l'absence d'un effet direct de ce polymorphisme sur le profil lipidique, l'insulinémie, la glycémie ou l'IMC, et ce, contrairement aux études précédentes rapportant un lien entre le variant Thr et la dyslipidémie (347, 352, 363, 561), un surpoids corporel (371), l'hyperinsulinémie (345, 358, 365, 366) ou l'hyperglycémie (562). Assurément, il aurait été intéressant d'examiner l'impact de ce polymorphisme dans un cadre post-prandial, pour mieux cerner son effet sur la sécrétion de triglycérides suite à un repas.

Par contre, nous avons remarqué un impact significatif sur les niveaux de LDL-C et de cholestérol total et une tendance similaire pour les niveaux d'apo B uniquement chez les sujets présentant un syndrome de résistance à l'insuline. Ainsi, nos observations ont documenté une augmentation significative des niveaux de LDL-C, de cholestérol total chez les sujets homozygotes pour l'allèle T, comparativement au groupe Ala/Ala. Malgré une tendance similaire, les valeurs d'apo B n'ont pas atteint le seuil de signification.

De plus, nous avons également observé une hétérogénéité de l'effet du polymorphisme du I-FABP selon le statut de syndrome de résistance à l'insuline sur les niveaux d'insuline. Cependant, elle indique uniquement une tendance vers une diminution des niveaux insuliniques chez les sujets présentant un syndrome de résistance à l'insuline et porteurs d'un ou deux allèles mutés mais des analyses statistiques plus approfondies ne nous ont

pas permis de dresser un portrait stable de l'association entre le variant Thr et l'insulinémie. Les opinions sur l'impact de ce polymorphisme sur la sensibilité à l'insuline sont encore partagées (358, 362, 363, 366, 368), mais il est très probable que le jeune âge de nos sujets n'ait pas permis de mettre en évidence une altération des niveaux plasmatiques de l'insuline due à une exposition plus prolongée du muscle et du foie à une accumulation de TG associée au variant Thr, qui devient apparente chez l'adulte.

Les autres variables biochimiques, telles que le HDL-C, l'apo A-I, les TG, les acides gras libres et le glucose n'ont pas présenté de variations selon les génotypes du I-FABP en présence du syndrome de résistance à l'insuline.

Comme le syndrome de résistance à l'insuline représente un regroupement de facteurs de risques cardiovasculaires, notre objectif a été de déterminer l'identité des facteurs responsables de l'augmentation des niveaux de cholestérol total, de LDL-C et d'apo B. Parmi les facteurs investigués, seule la triglycéridémie a démontré une interaction avec le génotype du I-FABP sur les niveaux de cholestérol total, de LDL-C et d'apo B. On constate un effet modificateur des génotypes du I-FABP sur la relation entre les TG et le cholestérol total, le LDL-C et l'apo B démontrant un impact prépondérant du génotype Thr/Thr par rapport aux groupes Ala/Thr et Ala/Ala, ce qui met en relief l'effet récessif de l'allèle muté. Cette relation se traduit par une augmentation plus prononcée des niveaux de cholestérol total, de LDL-C et d'apo B chez les sujets du groupe Thr/Thr uniquement, parallèlement à la triglycéridémie. Ces données suggèrent que les concentrations plasmatiques de TG représentent l'élément qui explique

l'interaction entre le I-FABP et le syndrome de résistance à l'insuline et que la présence simultanée du génotype Thr/Thr et d'une hypertriglycéridémie peut avoir des conséquences néfastes sur le profil lipidique se manifestant sous la forme de taux élevés de cholestérol total, de LDL-C et d'apo B.

A la lumière de nos résultats, nous suggérons que la relation entre la polymorphisme Ala54Thr et une élévation des niveaux de cholestérol ester, le LDL-C et d'apo B chez les sujets présentant un syndrome de résistance à l'insuline est principalement due à l'impact de l'allèle muté sur la lipémie postprandiale déjà confirmé *in vitro* et dans le cadre de plusieurs études populationnelles. En effet, une augmentation du transport intestinal des lipides et de la lipémie postprandiale peut engendrer une accumulation de chylomicrons. La captation R-CM par le foie pourrait être associée à une surproduction de VLDL qui seront par la suite catabolisés en particules LDL contribuant également à une élévation des niveaux de cholestérol total et d'apo B. Ce processus est particulièrement accentué en présence d'une résistance à l'insuline ou d'une hypertriglycéridémie, toutes les deux rencontrées dans le syndrome de résistance à l'insuline, ce qui explique que l'effet du variant Thr s'est manifesté uniquement chez les sujets atteints du syndrome de résistance à l'insuline et en conjonction avec la triglycéridémie.

En résumé, le projet portant sur le polymorphisme Ala54Thr suggère d'une part, que le variant Thr pourrait avoir un impact sur la lipémie post-prandiale en soutenant une hypersécrétion de TG ou de chylomicrons par l'entérocyte. D'autre part, nous proposons que ce polymorphisme ne soit pas associé à une prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline, mais

présenterait une variabilité dans l'expression de la dyslipidémie en présence du syndrome de résistance à l'insuline ou d'hypertriglycéridémie et constituerait un élément important à considérer dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires.

Tout comme le FABP, le MTP constitue un élément essentiel dans la formation des lipoprotéines. La morphologie, le développement et les changements fonctionnels de l'intestin fœtal humain ont été étudiés en profondeur (554). Néanmoins, les processus relatifs à la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines méritent une attention particulière, étant donné les nombreux aspects encore inexplorés. Par conséquent, afin de mieux caractériser le rôle du MTP dans le métabolisme des lipoprotéines, notamment dans l'intestin fœtal, nous avons examiné son profil ontogénique, sa distribution et sa régulation par les composantes lipidiques. À ce sujet, nous nous sommes basés sur l'hypothèse que le petit intestin humain exprime le MTP, étant donné sa capacité à synthétiser et à secréter des lipoprotéines contenant l'apo B. Par contre, la faible activité du MTP serait à l'origine d'une réduction de l'assemblage des particules lipoprotéiques dans le côlon. L'identification du MTP et du PDI, son co-facteur, par immunofluorescence révèle que ces deux protéines sont présentes autant dans l'intestin grêle que dans le côlon. De plus, elles présentent une distribution similaire au niveau de l'axe cryptes-villosités. Lors de l'analyse de l'activité enzymatique et des niveaux protéiques du MTP, on a pu constater que le MTP démontre un gradient proximal-distal descendant, tandis que la quantité de PDI reste constante. Par ailleurs, l'activité du MTP dans la partie

grêle de l'intestin tend à augmenter entre 13 et 22 semaines de gestation, ce qui reflète des changements ontogéniques en parallèle à ceux préalablement rapportés dans notre laboratoire et qui documentent une augmentation dans la synthèse et la sécrétion lipidiques en fonction de l'avancement de l'âge gestationnel. Il est à préciser que ce phénomène coïncide avec une période qui annonce une croissance maximale chez le fœtus (552, 554). Cependant, dans le côlon, ce paramètre reste inchangé. À ce niveau, on a enregistré une activité du MTP extrêmement réduite qui représente près de 10% de celle retrouvée dans le jéjunum, ce qui justifie la capacité limitée de cet organe à synthétiser et à secréter des lipides et des lipoprotéines (554). En dernier lieu, le MTP s'est montré invariable sous l'influence de l'acide oléique, ce qui suggère que les composés lipidiques n'exercent pas de régulation directe sur les niveaux protéiques ou sur l'activité enzymatique du MTP. Globalement, ces données montrent d'une part, que l'intestin humain exprime le MTP dès l'âge gestationnel, selon une distribution et une ontogenèse bien définies et d'autre part, qu'une réduction dans la quantité et l'activité de cette protéine serait à la base d'une altération de la synthèse et de la sécrétion de lipoprotéines dans le côlon.

Même si l'hypothèse concernant l'implication du MTP dans les étapes d'initiation et de finition de la particule lipoprotéique devient de plus en plus acceptée, le processus et le site exact de transfert des lipides restent à déterminer. Dans ce sens, le deuxième volet de cette partie vise à identifier d'autres sites intracellulaires susceptibles de contenir le MTP et le PDI ainsi qu'à évaluer la relation entre le MTP et l'apo B, en vue de donner un aperçu

sur l'implication de ces compartiments intracellulaires dans l'élaboration des particules lipoprotéiniques. Les spécimens intestinaux utilisés pour cette partie de l'étude proviennent du ligament de Treitz prélevés chez des rats. La présence du MTP a été détectée dans plusieurs compartiments intracellulaires dont le RE et l'appareil de Golgi. Le double marquage a démontré la co-localisation du MTP, du PDI et de l'apo B au sein de ces mêmes compartiments, reflétant la présence concomitante de la lipoprotéine et du MTP actif. Afin de confirmer cette interaction physique, des analyses biochimiques ont été effectuées. D'une part, nous avons procédé à l'isolation des fractions golgiennes par fractionnement cellulaire, précipité le MTP avec des anticorps anti-MTP et révélé la présence du PDI et de l'apo B par Western grâce à des anticorps anti-PDI et anti-apo B. D'autre part, nous avons examiné l'activité enzymatique du MTP dans ces deux compartiments qui s'est avérée similaire, ce qui vient appuyer les évidences en faveur de l'activité du MTP dans l'appareil de Golgi.

Assurément, la pureté de ces deux fractions a été vérifiée avec précaution pour éviter toute contamination potentielle. Par ailleurs, nous avons confirmé que la présence du MTP dans le Golgi n'est pas secondaire à une fuite provenant du RE. En effet, la quantité qu'on retrouve dans l'appareil de Golgi est près de trois fois plus élevée que celle présente dans le RE et d'autre part, la présence d'une protéine-marqueur du RE, la GRP-78, a été révélée par immunocytochimie uniquement à proximité de cet organelle, mais pas dans l'appareil de Golgi.

Nombre de résultats obtenus notamment dans le cadre d'études utilisant des modèles hépatocytaires font état de la présence de l'apo B lié à la membrane des fractions golgiennes (563, 564). Cette présence n'est pas uniquement due au transit de la particule lipoprotéinique contenant l'apo B à partir du RE, mais on y retrouve aussi une quantité non-négligeable associée aux membranes golgiennes. En accord avec les données précédentes, notre étude nous a permis de détecter l'apo B au niveau des membranes golgiennes préalablement isolées, ce qui démontre que cette apo fait partie intégrante de l'appareil de Golgi. De plus, sous l'inactivation du MTP en présence du BMS-200150, nous avons constaté un ralentissement soutenu de l'expulsion de l'apo B hors des fractions golgiennes. En réalité, la présence de l'apo B reflète l'implication de l'appareil de Golgi dans la séquence d'assemblage des lipoprotéines et sa participation à la finition de la particule par l'ajout de TG et de PL, ainsi qu'à plusieurs modifications post-traductionnelles et à la phosphorylation, la glycosylation et même la dégradation de l'apo B (565-567).

En résumé, la présence du MTP actif et de l'apo B, ainsi que leur interaction au niveau de l'appareil de Golgi viennent renforcer l'hypothèse accordant aux fractions golgiennes une place de choix dans l'assemblage et la maturation des particules riches en TG, un aspect qui a été jusqu'à présent très peu exploré (568-571). Le mécanisme proposé à la lumière de nos constatations implique la formation d'une particule lipoprotéinique naissante contenant l'apo B au niveau du RE et une lipidation subséquente qui sera complétée dans les fractions golgiennes. Ce processus de maturation de la

particule pourrait être modulé par le MTP, responsable du transfert de lipides disponibles dans le compartiment golgien vers le noyau de la lipoprotéine, lui permettant un enrichissement en TG et une conformation favorable à sa sécrétion.

Le seul polymorphisme fonctionnel dans le gène du MTP est situé dans la région du promoteur, à – 493, et se traduit par la substitution d'une base G par une base T. Même si le nombre d'études portant sur ce polymorphisme est restreint, on suggère que l'allèle T induit une augmentation de l'expression génique du MTP, ce qui conduit à une surproduction de lipoprotéines (384). Toutefois, dans le cadre de l'étude de l'effet de ce polymorphisme sur la synthèse et la sécrétion lipidique par les explants intestinaux humains, l'allèle muté n'a pas affiché d'impact sur le métabolisme des lipides. Dans le même ordre d'idées, l'ensemble des analyses effectuées au sein de notre population canadienne française ne suggèrent pas que ce polymorphisme puisse conférer une prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline ou modifier les paramètres biochimiques associés à ce syndrome, ce qui confirme les résultats obtenus chez les descendants des participants à l'étude Framingham (387). Néanmoins, il est à noter que la littérature nous rapporte des données divergentes quant à l'effet de l'allèle T sur les niveaux de cholestérol total (382, 386, 388, 389), de LDL-C (382, 384, 386, 394), d'apo B (382, 386, 389), de TG (386, 390, 393), d'insulinémie (382, 389) et sur l'IMC (382), ainsi que sur le risque cardiovasculaire encouru (388).

Il nous semble donc probable que ce génotype contribue à une susceptibilité pour certaines pathologies, telles que la résistance à l'insuline ou le diabète de type 2, mais il requiert, pour son expression, d'autres facteurs génétiques ou environnementaux nécessaires au déclenchement de l'expression phénotypique, facteurs qui pourraient varier d'une population à une autre.

La place privilégiée qu'occupe le LDL-cholestérol dans le développement des maladies cardiovasculaires est maintenant bien documentée. Toutefois, la classe des LDL se compose d'une population très hétérogène de particules qui diffèrent selon leur taille, densité et composition lipidique (403).

Ainsi, les particules de LDL petites et denses ont été très souvent associées avec une dyslipidémie caractéristique retrouvée dans certaines maladies cardiovasculaires (414-420) et dans le syndrome de résistance à l'insuline (443, 444, 437).

Puisque les recherches visant l'étude de la taille des LDL au sein de populations pédiatriques sont très restreintes, l'objectif de ce volet était de décrire en détails la distribution des valeurs de la taille des particules LDL et d'identifier les composantes biochimiques qui lui sont associées. Par ailleurs, il était important d'évaluer la possibilité de remplacer une détermination directe par des rapports construits à partir de variables disponibles dans un bilan lipidique complet. En réalité, il s'agit de la seule étude d'une telle envergure portant sur la taille des particules LDL dans une population pédiatrique. Le seul travail comparatif disponible apportant des données

descriptives relatives à la taille des particules LDL est l'étude Bogalusa Heart Study (489), avec un échantillon de 918 jeunes âgés de 10 à 17 ans. Toutefois, dans cette étude, les déterminations ont été réalisées par spectroscopie en NMR, une méthode qui génère des valeurs très différentes de celles obtenues par électrophorèse sur gel gradient, qui représente le procédé le plus répandu (572).

Tout d'abord, les données que nous avons obtenues présentent une distribution normale avec une valeur médiane de 262.7 Å (valeur minimale: 249,17 Å; valeur maximale: 274.89 Å). Cet intervalle est plus restreint que celui obtenu dans un échantillon d'adultes faisant partie de l'Étude Cardiovasculaire de Québec : 232-281 Å (416). Ceci nous indique également que même si on retrouve des valeurs inférieures à 255 Å indicatives d'un risque cardiovasculaire élevé chez les jeunes, les valeurs extrêmement basses apparaissent uniquement lors du passage à l'âge adulte. En fait, l'étude de l'influence de l'âge et du sexe nous révèle que les adolescents de 16 ans ont, en moyenne, des LDL plus petites que les jeunes de 9 et 13 ans et que les filles présentent une moyenne plus élevée, en comparaison avec les garçons. Nos résultats confirment des données obtenues précédemment dans le cadre de l'étude Bogalusa et montrant des valeurs de la taille des particules de LDL plus élevées chez les filles, comparativement aux garçons (489). Quant à lui, l'effet de l'âge a très peu été exploré jusqu'à présent. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires pour définir l'association entre l'âge et la taille des particules LDL dans la population pédiatrique.

Dans notre population, la valeur seuil de 255 Å indiquant un phenotype B pro-athérogénique n'est retrouvée que chez 2,1 % des sujets, ce qui est extrêmement bas par rapport à la prévalence retrouvée chez les adultes nord-américains (environ 40%) (573) ou chez les enfants japonais (490, 494) ou américains (489) (environ 10%).

La proportion de jeunes ayant de petites et denses particules de LDL ne varie pas en fonction de l'âge ou du sexe, mais affiche des valeurs plus élevées chez les sujets présentant un syndrome de résistance à l'insuline (10.4%) ou un IMC supérieur au 85ème percentile (6.8%), ce qui confirme les conclusions obtenues dans le cadre de populations adultes (428, 437, 439-441, 443-445). Même si les études pédiatriques antérieures n'ont pas encore exploré la relation entre la taille des particules LDL et le syndrome de résistance à l'insuline, parmi les données disponibles chez l'enfant, on rapporte toutefois une corrélation entre la taille des particules LDL et certains facteurs de risque cardiovasculaires comme l'obésité, la résistance à l'insuline ou un profil lipidique athérogénique (494, 495, 489, 490, 499).

Puisque la mesure directe de la taille des particules LDL occupe une place importante dans l'évaluation globale du risque athérosclérotique, mais requiert une méthodologie très minutieuse et difficilement adaptable à un bilan lipidique routinier, plusieurs chercheurs ont étudié la possibilité de la remplacer par des rapports incluant des paramètres biochimiques facilement accessibles. A ce sujet, plusieurs rapports ont été proposés : Chol Total/HDL-C (476), TG/HDL, avec ou sans transformation logarithmique (480, 482), LDL-C/apoB (443, 475, 488) et apo B/HDL (480), mais leur utilisation comme

substitut de la méthode directe reste encore controversée. Dans le cadre de notre étude, le rapport ayant affiché la meilleure corrélation avec la taille des particules LDL est log(TG/HDL) ou logTg/HDL, suivi par Cholestérol total/HDL-C et apo B/HDL. La corrélation la plus faible a été notée avec le rapport LDL/apo B. Ces données renforcent des concepts antérieurs stipulant que parmi tous les rapports disponibles, celui impliquant les valeurs d'HDL-C et de TG est le plus rapproché de la valeur de la taille des LDL (480, 482).

En ce qui a trait aux faibles valeurs relatives au rapport LDL/apo B, on peut les attribuer à l'association entre le LDL-C et la taille des LDL. Il s'agit en réalité d'une relation assez complexe, ce qui peut expliquer, d'une certaine manière, les données contradictoires obtenues au sein des différentes populations. En effet, la concentration plasmatique de LDL-C ne reflète aucunement le nombre de particules LDL. Puisqu'on retrouve une molécule d'apo B par particule de LDL et étant donné que la quantité de cholestérol par particule de LDL peut varier considérablement d'une personne à l'autre, ce nombre de particules LDL est plutôt associé aux niveaux plasmatiques d'apo B (574). Par ailleurs, les études sont très partagées quant à la relation entre les niveaux de LDL-C et la taille des particules LDL, en rapportant soit une absence d'association, soit une corrélation positive, négative ou parabolique entre ces deux variables (428, 437, 440, 443). Outre la relation entre la taille des particules LDL et ces rapports, nous avons examiné la capacité du rapport Tg/HDL à identifier les sujets porteurs du phénotype B caractérisé par des LDL petites et denses. La sensibilité et la spécificité correspondant à trois valeurs-seuil citées dans la littérature, 0.9, 1.33 et 1.7 (480, 575, 576) n'a pas

dépassé 85.9% et 97.6% respectivement, ce qui cède la place à un nombre non-négligeable de déterminations fausses-négatives et fausses-positives.

Malgré certaines corrélations étroites entre la taille des particules LDL et plusieurs des rapports étudiés, nous ne recommandons pas le remplacement d'une détermination directe par ces indices indirects. En effet, la substitution d'un procédé par un autre exige un accord élevé entre les données obtenues, reflété par un coefficient de corrélation d'au moins 0.90, or les valeurs des coefficients de corrélation que nous avons obtenues ne dépassent pas 0.56.

L'analyse visant l'identification des facteurs lipidiques, glucidiques et anthropométriques associés à la taille des particules LDL et la caractérisation de ces relations a permis l'émergence de plusieurs facteurs. Les deux éléments qui présentent l'impact le plus apparent sur la valeur de la taille des particules LDL sont les TG et le HDL-C. Ces données confirment d'une part l'étroite association de la triglyceridémie et des taux de HDL-C avec la taille des particules LDL et d'autre part la relation indiquant la présence concomitante d'une hypertriglyceridémie, de LDL petites et denses et de faibles taux de HDL (479, 480, 482). Par contre, de faibles associations ont été constatées entre la taille des particules LDL et les valeurs d'apo B, de cholestérol total, de LDL-C, d'apo A-I, d'insuline ou de l'IMC. De plus, les corrélations avec le glucose et les acides gras libres n'a pas atteint le seuil de la signification. Nos données réaffirment ainsi les associations antérieurement documentées entre la taille des particules LDL et l'insuline,

l'apo B, l'apo A-I et le cholestérol total, et ce, autant chez l'adulte que chez l'enfant (437, 444, 448, 476, 490, 494, 495, 573).

Toutefois, l'analyse par de simples coefficients de corrélation n'est aucunement suffisante pour caractériser la relation entre la taille des particules LDL et les différentes variables biochimiques, puisque ces dernières affichent des interrelations pouvant déformer l'association avec la taille des LDL. Ainsi, pour déterminer la contribution de chacune des variables, nous avons fait appel à des modèles de régression multiple permettant d'isoler une variable particulière en tenant compte d'un ajustement considérant la présence des autres variables. Après avoir pris en considération l'âge, le sexe, l'IMC et les valeurs d'apo B, de HDL-C et d'insuline, les TG ont montré une forte association négative avec la taille des particules LDL. En effet, une augmentation d'un écart-type dans la valeur des TG se traduit par une diminution de 1,2 Å au niveau de la taille des particules LDL. De la même manière, le HDL-C a affiché une forte association positive sous la forme d'une augmentation de 1,1 Å pour chaque écart-type. Une plus faible association a été observée dans le cas de l'apo B et après ajustement pour les autres variables, l'IMC n'a plus été en mesure d'atteindre le seuil de signification.

L'association entre la taille des particules LDL et l'insuline mérite une attention particulière étant donné les résultats quelque peu surprenants que nous avons obtenus. En effet, dans un premier temps, la corrélation entre l'insulinémie et la taille des particules LDL s'est révélée négative quoiqu'un peu faible. Par contre, au sein du modèle de régression multiple, elle est

demeurée significative, prenant cette fois-ci une forme positive. À première vue, ce phénomène peut paraître paradoxal mais en regardant de plus près la nature de cette relation, nous avons constaté qu'elle reflète en réalité la véritable association entre la taille des particules LDL et l'insulinémie. En effet, la première corrélation négative peut être expliquée par les répercussions de la résistance à l'insuline ou d'une hyperinsulinémie sur le métabolisme des lipoprotéines riches en TG. Tel que déjà discuté, une production excessive de VLDL par le foie ou une diminution de l'hydrolyse des chylomicrons, deux phénomènes souvent associés à la résistance à l'insuline, peuvent donner naissance à des particules LDL petites et denses. Néanmoins, une fois dissociée de la triglycéridémie, l'insuline peut avoir des effets adverses sur la taille des particules LDL. En premier lieu, plusieurs études ont montré que la sensibilité à l'insuline n'était pas associée, de manière indépendante, à la taille des particules LDL (577-580). Deuxièmement, au-delà des effets de la résistance à l'insuline sur le métabolisme des lipoprotéines riches en TG favorisant la formation de LDL petites et denses, l'hyperinsulinémie peut moduler de manière directe le profil sécrétoire des VLDL par le foie, en influençant la quantité de TG et d'apo B qui y sera incorporée. À ce niveau, l'insuline est en mesure de diminuer le flux d'acides gras et la formation de TG qui l'accompagne et est ainsi responsable d'une inhibition de la sécrétion de particules de VLDL enrichies en TG en faveur de particules plus denses et de plus petite taille (581, 582). Au fil de la cascade de délipidation VLDL-IDL-LDL, ces dernières sont moins susceptibles de former une particule LDL petite et dense, ce qui expliquerait

la relation positive entre l'insulinémie et la taille des particules LDL, après ajustement pour les autres variables.

En conclusion, ce volet nous a premièrement permis d'établir la distribution des valeurs de la taille des particules LDL dans une population pédiatrique pouvant servir de valeurs de référence pour de futures études locales ou internationales. Par ailleurs, l'association de la taille des particules LDL avec plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire et la prédominance des LDL petites et denses chez les sujets obèses ou atteints du syndrome de résistance à l'insuline nous porte à suggérer que cette expression précoce du phénotype des LDL petites et denses est en mesure d'engendrer une exposition à un risque élevé de maladies cardiovasculaires. Finalement, à la lumière de nos résultats, nous proposons de faire appel à une mesure directe de la taille des particules LDL, puisqu'aucun des rapports étudiés n'est digne d'une même précision.

La relation entre l'intestin et la circulation sanguine se présente de manière réciproque, puisque certains éléments plasmatiques ont la capacité de moduler certaines fonctions intestinales et vice versa. Un de ces facteurs ayant retenu notre attention est la leptine. La présence de la leptine et de ses récepteurs fonctionnels au niveau du tractus gastrointestinal (505, 506, 526, 527) a suscité de nombreuses questions quant à son rôle dans le transport intestinal des nutriments. Toutefois, les recherches n'en sont qu'à leur début et les données disponibles sont très restreintes. On rapporte malgré tout une inhibition de l'absorption intestinale des glucides (518), une augmentation du transport des oligopeptides (534) ainsi qu'une augmentation de l'absorption

de l'acide butyrique, un acide gras à chaîne courte (535). De plus, aucune autre étude n'a encore fait état de l'effet de la leptine sur le transport intestinal des lipides. Par conséquent, dans un contexte d'obésité et d'hyperleptinémie, nous avons jugé qu'il était absolument essentiel d'étudier l'impact de la leptine sur le métabolisme intestinal des lipides, afin d'apporter de nouveaux éléments pouvant expliquer la lipémie post-prandiale et l'état hypertriglycéridémique souvent associé à l'obésité et au syndrome de résistance à l'insuline. Ainsi, le but de cette étude a été d'examiner le profil des lipides, la formation et la sécrétion des lipoprotéines et la biogenèse des apos dans les cellules Caco-2 sous l'effet de la leptine.

L'immunocytochimie a permis la localisation prédominante des récepteurs à la leptine à proximité de la membrane basolatérale et très minime au niveau de la membrane apicale. La détection au niveau du cytoplasme, des mitochondries et du noyau s'est avérée négligeable. Une autre étude immunohistochimique a permis de localiser l'isoforme à bras long ou fonctionnelle du récepteur à la leptine dans les entérocytes humains, de rat et de souris. Dans tous les cas, les récepteurs étaient présents dans le cytoplasme des villosités et des cryptes, ainsi que près de la membrane basolatérale. Dans le cas des entérocytes humains, on notait également la présence de récepteurs dans la bordure en brosse (526), ce qui diffère quelque peu des données que nous avons obtenues.

En ce qui a trait aux différentes fractions lipidiques, les résultats démontrent que leur contenu cellulaire n'a aucunement été affecté par la leptine. Par contre, on a noté une diminution de la sécrétion des TG dans le

milieu basolatéral tandis que les autres fractions, soient les monoacylglycérols, les diglycérols et le cholestérol ester sont demeurés inchangées. En ce qui concerne les lipoprotéines, la leptine a été responsable d'une diminution de la sécrétion des chylomicrons et des LDL seulement, les niveaux des HDL et ses VLDL demeurant constants.

Les changements les plus remarquables ont été notés dans la synthèse et la sécrétion des apos. L'impact de la leptine s'est manifesté par une diminution de la synthèse et de la sécrétion des apo B-100 et apo B-48, les deux apos structurantes des VLDL et des chylomicrons respectivement. De plus, la synthèse et la sécrétion basolatérale des apos A-I et A-IV sont substantiellement élevées, tandis que l'apo E démontre une augmentation de la synthèse, parallèlement à une diminution de la sécrétion.

Un fait intéressant à noter est que l'administration de la leptine au niveau de la membrane apicale n'a produit aucun des effets ci-haut mentionnés, ce qui corrèle bien avec la concentration des récepteurs à proximité de la membrane basolatérale.

L'ensemble de ces résultats indiquent l'implication de la leptine dans l'assemblage et la sécrétion basolatérale des lipoprotéines et nous permettent d'envisager un rôle de facteur limitant à ce niveau. En effet, la diminution simultanée de la sécrétion de TG, de chylomicrons et des apos B-48 et B-100 indiquent que la leptine vise spécifiquement l'assemblage des lipoprotéines riches en TG. Comme le MTP est un élément clé dans la formation de la particule lipoprotéinique, nous avons également étudié sa modulation sous l'action de la leptine. Puisque la leptine n'a démontré aucun

impact sur l'activité du MTP, nous suggérons que les répercussions sur l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines pourraient être expliquées par un autre mécanisme que celui impliquant le MTP. A ce sujet, Borchard et Davis (583) ont démontré que même en présence de MTP, une proportion substantielle d'apo B subira une dégradation intracellulaire, et ce, avant sa sécrétion. La transcription de l'apo B est constitutive et n'est pas sujette à une régulation potentielle. Par contre, la dégradation par la voie protéasome-ubiquitine (556, 557) détermine la production des apoliprotéines B-100 et B-48 et peut être modulée par plusieurs facteurs, dont une lipidation servant à les protéger de l'action des protéases. Les voies de dégradation des apos B représentent des processus très complexes et des études supplémentaires sont nécessaires afin de définir avec exactitude le mécanisme d'intervention de la leptine dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines intestinales.

L'augmentation spectaculaire des niveaux d'apo A-IV acquiert ici une importance capitale. Chez l'humain, cette apolipoprotéine de 46 kDa est produite exclusivement par les entérocytes et sa synthèse est stimulée par la formation et la sécrétion de chylomicrons, ainsi que par l'administration d'un repas riche en lipides. Par ces diverses fonctions, l'apo A-IV confère une importante protection contre l'athérosclérose. En effet, elle intervient dans le métabolisme plasmatique des lipoprotéines en facilitant l'action de la LPL en faveur d'une meilleure clearance des lipoprotéines riches en TG et en favorisant l'efflux cellulaire de cholestérol et son transport inverse. De plus, l'apo A-IV est reconnue pour ses effets anorexigènes et pour sa capacité antioxydante (584). Par conséquent, il est intéressant de noter que la leptine

est associée, à travers une élévation marquante des niveaux d'apo A-IV, à cette vaste gamme d'effets réducteurs du risque athérosclérotique.

Deux autres études font état d'une association entre les niveaux de leptine et d'apo A-IV, mais par opposition à nos données, elles montrent une réduction significative. La première (527) révèle une diminution des niveaux d'ARNm de l'apo AIV dans le jéjunum de souris suite à l'administration intraveineuse de leptine et la deuxième (585) montre une réduction des niveaux d'apo A-IV dans le jéjunum et l'iléon de rat lors d'une infusion intraduodénale de leptine. On pourrait attribuer les discordances entre nos données et celles des deux études ci-haut mentionnées aux modèles expérimentaux et aux conditions utilisés.

L'ensemble des données de ce volet suggèrent que la leptine pourrait jouer un rôle essentiel dans le métabolisme intestinal des lipides se traduisant par une inhibition de la synthèse et la sécrétion lipoprotéinique, ce qui constituerait une barrière importante contre la lipémie post-prandiale et l'hypertriglycéridémie qui y est associée. Les résultats obtenus nous conduisent également vers l'hypothèse que la résistance à la leptine telle que rencontrée dans l'obésité est à la base d'un transport intestinal accéléré des lipides et du maintien de la lipémie post-prandiale caractéristique. Finalement, la leptine pourrait intervenir dans plusieurs processus visant le contrôle du poids corporel et la réduction du risque athérosclérotique à travers des facteurs intestinaux, tels que l'apo A-IV.

En résumé, les recherches complétées dans le cadre de ce projet situent l'intestin au centre de multiples désordres lipidiques associés à

l'obésité et à la résistance à l'insuline. En premier lieu, elles ont permis de mettre en évidence l'implication du polymorphisme Ala54Thr dans la détermination de la lipémie post-prandiale et son influence sur la dyslipidémie en présence du syndrome de résistance à l'insuline ou d'une hypertriglycéridémie, et ce, en dépit de l'absence de prédisposition au syndrome de résistance à l'insuline associée à ce polymorphisme. Par conséquent, ce polymorphisme représente un élément important à considérer lors de l'évaluation du risque athérosclérotique, contrairement au polymorphisme –493 G/T du MTP, pour lequel aucun effet n'a été observé.

Les études visant la caractérisation du MTP on permis de montrer son expression dans l'intestin fœtal humain, selon une ontogenèse et une distribution au long de l'axe intestinal bien précises et qu'une quantité limitée de MTP était à la base de l'altération de l'assemblage et de la sécrétion des lipoprotéines par le côlon. Par ailleurs, la présence simultanée du MTP actif et de l'apo B dans l'appareil de Golgi a permis d'attribuer à cet organelle un rôle privilégié dans l'assemblage et la maturation des lipoprotéines, impliquant un ajout supplémentaire de lipides.

En ce qui concerne le volet portant sur la taille des particules LDL, les données obtenues nous ont d'abord permis d'établir une distribution bien précise des valeurs correspondant au tailles des particules qui pourra constituer un précieux point de référence pour de futures études ou applications cliniques visant la population pédiatrique. De plus, l'association de la taille des particules LDL avec plusieurs facteurs de risque tels que l'hypertriglycéridémie et des taux réduits de HDL-C, ainsi qu'une

augmentation considérable de la prévalence du phénotype pro-athérogène reflétant la présence de LDL petites et denses chez les jeunes présentant un surpoids corporel ou le syndrome de résistance à l'insuline sont des indicateurs éloquents d'une exposition à un risque élevé de maladies cardiovasculaires précoce. Du point de vue technique, nous préconisons l'usage d'une détermination directe de la taille des particules LDL, étant donné la faible corrélation avec les marqueurs de substitution. Finalement, ce projet a mis en lumière les effets bénéfiques de la leptine sur le métabolisme intestinal des lipides et la lipémie post-prandiale, se manifestant par une inhibition de la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines.

Cette étude offre ainsi des outils précieux visant à sensibiliser les différents intervenants à l'importance d'une surveillance étroite des facteurs de risque cardiovasculaire et à la nécessité d'élaborer des mesures efficaces permettant de dépister, prévenir et traiter le syndrome de résistance à l'insuline, et ce, dès l'enfance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) **Basdevant A**, Obésité: épidémiologie et santé publique, Annales d'Endocrinologie, 2000, 61, Suppl au nr. 6, 6-11

2) **World Health Organization**, Life in the 21st century – A vision for All; The World Health Report, 1998, Geneva, Switzerland

3) **Flegan KM**, The obesity epidemic in children and adults: current evidence and research issues, Med Sci Sports Exerc, 1999, 31(11), S509-S514

4) **Troiano RP, Flegan KM**, Overweight Children and Adolescents: Description, Epidemiology, and Demographics, Pediatrics, 1998, 101(3), 497-504

5) **Flegan KM,Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL**, Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2000, JAMA, 2002, 288, 1723-1727

6) **Ogden CL, Flegan KM, Carroll MD, Johnson CL,** Prevalence and Trends in Overweight Among US Children and Adolescents, JAMA, 2002, 288, 1728-1732

7) **Torrance GM, Hooper MD, Reeder BA**, Trends in overweight and obesity among adults in Canada (1970-1992): evidence from national surveys using measured height and weight, Intern J Obes, 2002, 26, 797-804

8) **Hanley AJ, Harris SB, Gittelsohn J, Wolever TM, Saksvig B, Zinman B,** Overweight among children and adolescents in a Native Canadian community: prevalence and associated factors, Am J Clin Nutr, 2000, 71(3), 693-700

9) **Tremblay MS, Willms D**, Secular trends in the body masss index of Canadian children, Can Med Ass J., 2000,163(11), 1429-1433

10) **Willett WC, Dietz WH, Colditz GA**, New Engl J Med, 1999, 341(6), 427-434

11) **Visscher TLS, Seidell JC**, The Public Health Impact of Obesity, Ann Rev Public Health, 2001, 22, 355-375

12) **Birmingham CL, Muller JL, Palepu A, Spinelli JJ, Anis AH,** The cost of obesity in Canada, CMAJ, 1999,160(4):483-8

13) **Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB.,** Annual deaths attributable to obesity in the United States, JAMA. 1999, 282(16), 1530-8

14) **James, PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M,** The Woldwide Obesity Epidemic, Obesity Research, 2001, 9, Suppl. 4, 228S-233S

15) **World Health Organization,** Obesity – Preventing and managing the global epidemic. WHO Obesity Technical Report Series 894., 2000, Geneva, Switzerland, World Health Organization.

16) **Must A, Dallal GE, Dietz WH**, Referance data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht^2) and triceps skinfold thickness, Am J Clin Nutr, 1991, 53, 839-846

17) **Flegal KM, Ogden CL, Wei R, Kuczmarski RL, Johnson CL,** Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index, Am J Clin Nutr, 2001, 73(6), 1086-93

18) **Guillaume M,** Defining obesity in childhood : current practice, Am J Clin Nutr, 1999, 70 (suppl), 126S-130S

19) **Cole TJ, Bellizzi MC, Flegan KM, Dietz WH**, Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey, Br Med J, 2000, 320, 1-6

20) **Abrantes M.M., Lamounier J.A., Colosimo E.A.**, Comparison of body mass index values proposed by Cole et al. (2000) and Must et al. (1991) for identifying obese children with weight-for-height index recommended by the World Health Organization, Public Health Nutrition, 2003, 6(3), 307-311

21) **Wang Y, Wang JQ,** A comparison of international references for the assessment of child and adolescent overweight and obesity in different populations, Eur J Clin Nutr, 2002, 56, 973-982

22) **Kissebah AH,** Intra-abdominal fat: is it a major factor in developing diabetes and coronary artery disease?, Diabetes Res Clin Pract, 1996, 30 Suppl, 25-30

23) **Caprio S.** Relationship Between Abdominal Visceral Fat and Metabolic Risk Factors in Obese Adolescents, Am J Hum Biol, 1999, 11, 259-266

24) **Després JP**, Health consequences of visceral obesity, Ann Med, 2001, 33, 534-541

25) **Wajchenberg BL,** Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome, Endocrine Reviews, 2000, 21, 697-738

26) **Maffeis C, Tatò L,** Long-Term Effects of Childhood Obesity on Morbidity and Mortality, Hormone Research, 2001, 55(supl.1), 42-45

27) **Goran MI, Bergman RN, Gower BA**, Influence of Total vs. Visceral Fat on Insulin Action and Secretion in African American and White Children, Obesity Research, 2001, 9 (8), 423-431

28) **Gower BA,** Syndrome X in Children : Influence of Ethnicity and Visceral Fat, American Journal of Human Biology , 1999, 11, 249-257

29) **Goran MI, Gower BA,** Relation between visceral fat and disease risk in children and adolescents, Am J Clin Nutr, 1999, 70(suppl), 149S-156S

30) **Pérusse L**, Les bases génétiques de l'obésité humaine : résultats des études d'épidémiologie génétique, Annales d'Endocrinologie, 2000, 61 Suppl, 24-30

31) **Clément K, Ferré P**, Genetics and the Pathology of Obesity, Pediatr Res, 2003, 53, 721-725

32) **Koletkko B, Girardet J-P, Klish W, Tobacco O,** Obesity in Children and Adolescents Worldwide: Current Views and Future Directions – Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2002, 35, Suppl. 2, S205-S212

33) **Rankinen T, Perusse L, Weisnagel SJ, Snyder EE, Chagnon YC, Bouchard C,**The human obesity gene map, the 2001 update, Obes Res, 2002, 10, 196-243

34) **Chen D, Garg A,** Monogenic disorders of obesity and body fat distribution, J lopid Res, 1999, 40, 1735-1746

35) **Clément K,** Formes monogéniques d'obésité: de la souris à l'homme, Annales d'Endocrinologie, 2000, 61, Suppl. 6, 39-49

36) **Schonfeld-Warden N, Warden CH,** Pediatric obesity. An overview of etiology and treatment, Pediatr Clin North Am, 1997,44(2), 339-61

37) **Kopelman PG,** Obesity as a medical problem, Nature, 2000, 404, 635-643

38) **Moran R,** Evaluation and Treatment of Childhood Obesity, Am Fam Physician, 1999, 59(4), 861-8, 871-3

39) **Strauss R,** Childhood Obesity, Curr Probl Pediatr, 1999, 29(1), 5-29

40) **Bray GA, Popkin BM,** Dietary fat intake doas affect obesity, Am J Clin Nutr, 1998, 68, 1157-1173

41) **Golay A, Bobbioni E,** The role of dietary fat in obesity, Intern J Obes, 1997, Suppl. 3, S2-S11

42) **Rey J, Bresson JL,** Conséquences à long terme de la nutrition fœtale, Arch. Pédiatr, 1997, vol 4, 359-366

43) **Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY, Wong WP,**Fetal programming of appetite and obesity, Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 185, 73-79

44) **Barker DJ,** Fetal origins of cardiovascular disease, Annals of Medicine, 1999, 31(supl. 1), 3-6

45) **Cianfarani S, Geremia C, Germani D, Scire G, Maiorana A, Boemi S,** Insulin Resistance and Insulin-Like Growth Factors in Children with Intrauterine Growth Retardation, Hormone Research, 2001, 55(supl. 1), 7-10

46) **Newsome CA, Shiell AW, Fall CH, Phillips DI, Shier R, Law CM.** Is birth weight related to later glucose and insulin metabolism?--A systematic review, Diabet Med. 2003, 20(5), 339-48

47) **Lucas A**, Programing by early nutrition : an experimental approach, J Nutr, 1998, 128, 401S-406S

48) **Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB**, Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study, BMJ, 2000, 320, 967-971

49) **Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD**, Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 279, E83-E87

50) **Armstrong J, Reilly JJ, Child Health Information Team,** Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity, Lancet, 2002, 359(9322), 2003-4

51) **Dewey KG,** Is breastfeeding protective against child obesity?, J Hum Lact, 2003 Feb, 19(1), 9-18

52) **Maffeis C, Tatò L,** Long-Term Effects of Childhood Obesity on Morbidity and Mortality, Hormone Research, 2001, 55(supl.1), 42-45

53) **Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Srinivasan SR, Berenson GS**, BMI rebound, childhood height and obesity among adults: the Bogalusa Heart Study, Int J Obesity, 2001, 25, 543-549

54) **Whitaker RC, Pepe MS, Wright JA, Seidel KD, Dietz WH,** Early adiposity rebound and the risk of adult obesity, Pediatrics, 1998,101(3), E5-E10

55) **Jung RT**, Obesity as a disease, Britich Medical Bulletin, 1997, 53(2), 307-321

56) **Dietz WH,** Health Consequences of Obesity in Youth: Childhood Predictors of Adultd Disease, Pediatrics, 1998, 101, 518-525

57) **Deckelbaum RJ, Williams CL**, Childhood Obesity: The Health Issue, Obesity Research, 2001, 9 (Suppl.4), 239S-243S

58) **Steinberger J, Moran A, Hong C-P, Jacobs DR, Sinaiko AR,** Adiposity in childhood predicts obesity and insulin resistance in young adulthood, J Pediatr, 2001, 138, 469-473

59) **Yanovski JA**, Pediatric Obesity, Rev End Metab Dis, 2001, 2, 371-383

60) **Epstein LH, Myers M, Raynor HA, Saelens BE**, Treatment of Pediatric Obesity, Pediatrics, 1998, 101, 554-570

61) **Capeau J**. Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance, Médecine/Sciences, 2003, 19, 834-839

62) **Kahn CR**, Insulin resistance, insulin insensitivity and insulin unresponsiveness: a necessary distinction, Metabolism, 1978, 27, 1893-1902

63) **Whitelaw DC, Gilbey SG**, Insulin resistance, Ann Clin Biochem, 1998, 35, 567-583

64) **Ceffalu WT,** 'Insulin Resistance : Cellular and Clinical Concepts, EBM, 2001, 226, 13-26

65) **Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU,** Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance, Endocrine Reviews, 2000, 21, 585-618

66) **Lehtovirta M, Kaprio J, Forsblom C, Eriksson J, Tuomilehto J, Groop L,** Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins, Diabetologia, 2000, 43, 285-293

67) **Pedersen O**, Genetics of insulin resistance, Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1999, 107(2), 113-118

68) **Hunter SJ, Garvey T,** Insulin Action and Insulin Resistance: Diseases Involving Defects in Insulin Receptors, Signal Transduction, and the Glucose Transport Effector System, Am J Med, 1998, 105, 331-345

69) **Reaven GM, Laws A,** Insulin resistance – The Metabolic Syndrome X, Contemporary endocrinology, 1999, 19-34.

70) **Arslanian S, Suprasongsin C, Janosky JE,** Insulin Secretion and Sensitivity in Black Versus White Prepubertal Healthy Children, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1997, 82, 1923-1927

71) **Steinberger J, Moran A, Hong CP, Jacobs DR Jr, Sinaiko AR,** Adiposity in childhood predicts obesity and insulin resistance in young adulthood, J Pediatr. 2001, 138(4), 469-73

72) **Bhathena SJ, Velasquez MT,** Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, Am J Clin Nutr, 2002, 76(6), 1191-201

73) **Kelly GS**, Insulin Resistance: Lifestyle and Nutritional Interventions, Altern Med Rev, 2000, 5(2), 109-32

74) **Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP,** Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine, Lancet. 1998 Jan 17;351(9097):173-7

75) **Bavdekar A, Yajnik CS, Fall CH, Bapat S, Pandit AN, Deshpande V, Bhave S, Kellingray SD, Joglekar C,** Insulin Resistance Syndrome in 8-Year-Old Indian Children; Small at Birth, Big at 8 Years, or Both?, Diabetes, 1999, 48, 2422-2429

76) **Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC,** Birth Weight, Type 2 Diabetes, and Insulin Resistance in Pima Indian Children and Young Adults, Diabetes Care, 1999, 22, 944-950

77) **Li C, Johnson MS, Goran MI,** Effects of Low Birth Weight on Insulin Resistance Syndrome in Caucasian and African-American Children, Diabetes Care, 2001, 24, 2035-2042

78) **Elahi D, Muller DC, Egan JM, Andres R, Veldhuist J, Meneilly GS**, Glucose tolerance, glucose utilization and insulin secretion in ageing, Novartis Found Symp, 2002, 242, 222-242

79) **Stout RW,** 'Glucose tolerance and ageing, Journal of Royal Society of Medicine, 1994, 87, 608-609

80) **Arslanian S,** Insulin Secretion and Sensitivity in Healthy African-American vs American White Children, Clinical Pediatrics, 1998, 81-88

81) **Moran A, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, Sinaiko AR**, Insulin Resistance During Puberty ; Results From Clamp Studies in 357 Children, Diabetes, 1999, 48, 2039-2044

82) **Goran MI, Gower BA.**, Longitudinal Study on Pubertal Insulin Resistance, Diabetes, 2001, 50, 2444-2450

83) **Boden G,** Pathogenesis of Type 2 Diabetes, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2001, 30, 801-815

84) **Poirier P, Tremblay A, Broderick T, Catellier C, Tancrede G, Nadeau A,** Impact of moderate aerobic exercise training on insulin sensitivity in type 2 diabetic men treated with oral hypoglicemic agents : Is insulin sensitivity enhanced only in nonobese subjects?, Med. Sci. Monit., 2002, 8, CR59-CR65

85) **Creviston T, Quinn L,**Exercice and physical activity in the treatment of type 2 diabetes, Nursing Clinics of North America, 2001, 36 (2), 243-271

86) **DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R,** Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance, Am J Physiol, 1979, 237(3), E214-23

87) **Del Prato S,** Measurement of insulin resistance in vivo, Drugs, 1999, 58 Suppl 1:3-6, discussion 75-82

88) **Bergman RN, Finegood DT, Ader M,** Assessment of insulin sensitivity in vivo, Endocr Rev, 1985 Winter, 6(1), 45-86

89) **Scheen AJ**, Comment apprécier chez l'homme l'action de l'insuline en recherche et en pratique, Annales d'Endocrinologie (Paris), 1999, 60, 179-187

90) **Rabasa-Lhoret R, Laville M**, Mesurer l'insulinorésistance en pratique clinique, Diabetes Metab, 2001, 27 (2 Pt 2), 201-208

91) **Radziuk J,** Insulin Sensitivity and Its Measurement: Structural Commonalities Among the Methods, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, 4426-4433

92) **Bastard J-P, Grimaldi A, Jardel C, Porquet D, Bruckert E, Hainque B**, A simple index of insulin resistance, Diab Metab, 1997, 23, 87-88

93) **Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ**, Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(7), 2402-10

94) **Hauache OM, Vieira JG,** Fasting insulin concentration is highly correlated with quantitative insulin sensitivity check index, Endocrine, 2003, 21(2), 137-8

95) **Ferrannuni E, Mari A**, How to measure insulin sensitivity, J Hypertens, 1998, 16, 895-906

96) **Cutfield WS, Jefferies CA, Jackson WE, Robinson EM, Hofman,** Evaluation of HOMA and QUICKI as measures of insulin sensitivity in prepubertal children, Pediatr Diabetes, 2003, 4(3), 119-25

97) **Cutfield WS, Bergman RN, Menon RK, Sperling MA**, The modified minimal model: application to measurement of insulin sensitivity in children, J Clin Endocrinol Metab, 1990, 70, 1644-1650

98) **Silfen ME, Manibo AM, McMahon DJ, Levine LS, Murphy AR, Oberfield SE,** Comparison of simple measures of insulin sensitivity in young girls with premature adrenarche: the fasting glucose to insulin ratio may be a simple and useful measure, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(6), 2863-8

99) **Allard P, Delvin EE, Paradis G, Hanley JA, O'Loughlin J, Lavallee C, Levy E, Lambert M,** Distribution of fasting plasma insulin, free fatty acids, and glucose concentrations and of homeostasis model assessment of insulin resistance in a representative sample of Quebec children and adolescents, Clin Chem, 2003, 49(4), 644-9

100) **Reaven GM**, Banting lecture 1988. Role of insulin resisatnce en human disease, Diabetes, 1988, 37, 1595-1607

101) **Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L,** Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome, Diabetes Care, 2001, 24(4), 683-9

102) **Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, Ehrnstrom BO, Forsen B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR,** Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects, Diabetes, 1996, 45(11), 1585-93

103) **Ford ES, Giles WH, Dietz WH**, Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults. Findinds From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, JAMA 2002, 287(3), 356-359

104) **Timar O, Sestier F, Levy E**, Metabolic syndrome X: A review. Can J Cardiol, 2000, 16 (6), 779-789

105) **Lebovitz HE**, Rationale for the Role of Thiazolidinediones in Type 2 Diabetes Mellitus, Am J Cardiol, 2002, 90(Suppl), 34G-41G

106) **Zimmet P, Boyko EJ, Collier GR, De Courten M.** Etiology of the Metabolic Syndrome: Potential Role of Insulin Resistance, Leptin Resistance, and Other Players, Ann N Y Acad Sci, 1999, 18, 892, 25-44

107) **Alberti K, Zimmet P, Consultation W**, Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. Diabetic Medicine, 1998, 15, 539-553

108) **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults**, Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), JAMA, 2001, 285, 2486-2497

109) **Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, Morris R, Zavaroni I, van Dam R, Feskins E, Gabriel R, Diet M, Nilsson P, Hedblad B; European Group For The Study Of Insulin Resistance (EGIR),** Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome, Diabetes Metab, 2002, 28(5), 364-76

110) **Bao W, Srinivasan SR, Berenson GS,** Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. The Bogalusa Heart Study, Circulation, 1996, 93(1), 54-9

111) **Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS,** Cardiovascular risk factors clustering features of insulin resistance syndrome (Syndrome X) in a biracial (Black-White) population of children, adolescents, and young adults: the Bogalusa Heart Study, Am J Epidemiol, 1999, 150(7), 667-74

112) **Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS,** The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart Study, Pediatrics, 1999, 103(6 Pt 1), 1175-82

113) **Jiang X, Srinivasan SR, Webber LS, Wattigney WA, Berenson GS,** Association of fasting insulin level with serum lipid and lipoprotein levels in children, adolescents, and young adults: the Bogalusa Heart Study, Arch Intern Med, 1995, 155(2), 190-6

114) **Raitakari OT, Porkka KV, Viikari JS, Ronnemaa T, Akerblom HK,** Clustering of risk factors for coronary heart disease in children and adolescents. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, Acta Paediatr, 1994, 83(9), 935-40

115) **Porkka KV, Raitakari OT, Leino A, Laitinen S, Rasanen L, Ronnemaa T, Marniemi J, Lehtimaki T, Taimela S, Dahl M, Uhari M, Akerblom HK, Viikari JS,** Trends in serum lipid levels during 1980-1992 in children and young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, Am J Epidemiol, 1997, 146(1), 64-77

116) **Akerblom HK, Viikari J, Raitakari OT, Uhari M,** Cardiovascular Risk in Young Finns Study: general outline and recent developments, Ann Med, 1999, Suppl 1, 45-54

117) **Batey LS, Goff DC Jr, Tortolero SR, Nichaman MZ, Chan W, Chan FA, Grunbaum J, Hanis CL, Labarthe DR,** Summary measures of the insulin resistance syndrome are adverse among Mexican-American versus non-Hispanic white children: the Corpus Christi Child Heart Study, Circulation, 1997, 96(12), 4319-25

118) **Lai SW, Ng KC, Lin HF, Chen HL,** Association between obesity and hyperlipidemia among children, Yale J Biol Med, 2001, 74(4), 205-10

119) **Dwyer T, Blizzard L, Venn A, Stankovich JM, Ponsonby AL, Morley R,** Syndrome X in 8-y-old Australian children: stronger associations with current body fatness than with infant size or growth, Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 10, 1301-9.

120) **Geib HC, Parhover KG, Schwandt P**. Parameters of childhood obesity and their relationship to cardiovascular risk factors in healthy prepubescent children, Int J Obes, 2001, 25, 830-837

121) **Valle M, Gascon F, Martos R, Ruz FJ, Bermudo F, Morales R, Canete R,** Metabolic cardiovascular syndrome in obese prepubertal children: the role of high fasting insulin levels, Metabolism, 2002, 51(4), 423-8

122) **Glowinska B, Urban M, Koput A, Galar M,** New atherosclerosis risk factors in obese, hypertensive and diabetic children and adolescents, Atherosclerosis, 2003, 167, 275-286

123) **Daniels SR, Morrison JA, Sprecher DL, Khoury P, Kimball TR,** Association of body fat distribution and cardiovascular risk factors in children and adolescents, Circulation, 1999, 99(4), 541-5

124) **Freedman DS, Serdula MK, Srinivasan SR, Berenson GS,** Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study, Am J Clin Nutr, 1999, 69(2), 308-17

125) **Gower BA, Nagy TR, Goran MI,** Visceral fat, insulin sensitivity, and lipids in prepubertal children, Diabetes, 1999, 48(8), 1515-21

126) **Moreno LA, Pineda I, Rodriguez G, Fleta J, Sarria A, Bueno M,** Waist circumference for the screening of the metabolic syndrome in children, Acta Paediatr, 2002, 91(12), 1307-12

127) **Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS,** The association of cardiovascular risk factor clustering related to insulin resistance syndrome (Syndrome X) between young parents and their offspring: the Bogalusa Heart Study, Atherosclerosis, 1999, 145(1), 197-205

128) **Chen W, Bao W, Begum S, Elkasabany A, Srinivasan SR, Berenson GS,** Age-related patterns of the clustering of cardiovascular risk variables of syndrome X from childhood to young adulthood in a population made up of black and white subjects: the Bogalusa Heart Study, Diabetes, 2000, 49(6), 1042-8

129) **Srinivasan SR, Myers L, Berenson GS,** Temporal association between obesity and hyperinsulinemia in children, adolescents, and young adults: the Bogalusa Heart Study, Metabolism, 1999, 48(7), 928-34

130) **Bao W, Srivanasan SR, Wattigney WA, Berenson GS**, Persistance of Multiple Cardiovascular Risk Clustering Related to Syndrome X From Childhood to Young Adulthood, Arch Intern Med, 1994, 154, 1842-1848

131) **Katzmarzyk PT, Perusse L, Malina RM, Bergeron J, Despres JP, Bouchard C,** Stability of indicators of the metabolic syndrome from childhood and adolescence to young adulthood: the Quebec Family Study, J Clin Epidemiol, 2001, 54(2), 190-5

132) **Weisburger JH**, Dietary fat and risk of chronic disease : mechanistic insights from experimental studies, J Am Diet Assoc, 1997, 97 (7 Suppl), S16-S23

133) **Shikany JM, White GL Jr,** Dietary guidelines for chronic disease prevention, South Med J, 2000, 93(12),1138-51

134) **McNamara DJ**, Dietary cholesterol and atherosclerosis, Biochim Biophys Acta, 2000, 1529, 310-320

135) **Bertrand L**, 1995, Les Québécoises et les Québecois mangent-ils mieux ? Rapport de l'Enquête québécoise sur la nutrition, 1990, Santé Québec, Montréal, Ministère de la Santé et des Services sociaux, gouvernement du Québec, 297p.

136) **Lichtenstein AH**, Dietary fat and cardiovascular disease risk : quantity or quality ?, J Womens Health (Larchmt), 2003, 12(2), 109-114

137) **Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, Gontier JR**, Physiologie humaine, deuxieme edition, McGraw-Hill, 1989, 801p.

138) **Phan CT, Tso P**, Intestinal lipid absorption and transport, Front Biosc, 2001, 6, d299-d319

139) **Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A**, Membrane proteins implicated in the long-chian fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm, Biochim Biophys Acta, 1999, 1441, 4-13

140) **Hajri T, Abumrad NA**, Fatty Acid Transport Across Membranes: Relevance to Nutrition and Metabolic Pathology, Annu Rev Nutr, 2002, 22, 383-415

141) **Tso P, Nauli A, Lo C-M**, Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein, Biochem Soc Trans, 2004, 32(1), 75-77

142) **McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroedes F**, Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids, J Lipid Res, 1999, 40, 1371-1383

143) **Boord JB, Fazio S, Linton MRF**, Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis, Curr Opin Lipidol, 2002, 13, 141-147

144) **Kwiterovich PO,** Lipoprotein Heterogeneity : Diagnostic and Therapeutic Implications , Am J Cardiology, 2002, 90 (8A), 1i-10i

145) **Van Greenvenbroek MMJ, De Bruin TWA**, Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo, Atherosclerosis, 1998, Suppl. 1, S9-S16

146) **Hussain MM,** A proposed model for the assembly of chylomicrons , Atherosclerosis, 2000, 148, 1-15

147) **Hultin M, Olivecrona T,** Conversion of chylomicrons into remnants, Atherosclerosis, 1998, 141 Suppl 1, S25-S29

148) **Rustaeus S, Lindberg K, Stillemark, Claesson C, Asp L, Larsson T, Boren J, Olofsson S-O**, Assembly of Very Low Density Lipoprotein : A Two-Step Process of Apolipoprotein B Core Lipidation, J Nutr, 1999, 129, 463S-466S

149) **Kang S, Davis RA**, Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion, Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1529, 223-230

150) **Trigatti BL, Rigotti A, Braun A**, Cellular and physiological roles of SR-BI, a lipoprotein receptor ehich mediates selective lipid uptake, Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1529, 276-286

151) **Von Eckardstein A, Nofer J-R, Assman G,** High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis – Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21, 13-27

152) **Kelley DE, Goodpaster BH,** Skeletal Muscle Triglyceride, Diabetes Care, 2001, 24, 933-941

153) **Bergman RN, Ader M,** Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus, TEM, 2000,11, 351-356

154) **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA,** The adipocyte : a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 280, E827-E847

155) **Rivellese AA, De Natale C, Lilli S,** Type of Dietary Fat and Insulin Resistance , Ann N Y Acad Sci, 2002, 967, 329-335

156) **McGarry JD**, Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes, Diabetes, 2002, 51, 7-17

157) **Randle PJ,** Regulatory interactions between lipids and carbohydrates; the glucose fatty acid cycle after 35 years, Diabetes Metab Rev, 1998, 14, 263-283

158) **Ziegler O, Quilliot D, Guerci B, Drouin P,** Macronutriments, masse grasse, flux d'acides gras et insulinosensibilite, Diabetes Metab, 2001, 27, 261-270

159) **Patti M-E,** Nutrient Modulation of Cellular Insulin Action, Annals New York Academy of Sciences, 2000, 187-203

160) **Schmitz-Peiffer C,** Signalling aspects on insulin resistance in skeletal muscle : mechanisms induced by lipid oversupply , 2000, Cell Signalling, 12, 583-594

161) **Ahmad Z, Lee FT, DePaoli-Roach A, Roach PJ**, Phosphorylation of glycogen synthase by the Ca2+ - and phosphoilipid-activated protein kinase (protein kinase C), J Biol Chem, 1984, 259, 8743-8747

162) **Sleeman MW, Donegan NP, Heller-Harrisson R, Lane WS, Czech MP**, Association of acyl-CoA synthetase-1 with GLUT4-containing vesicles, J Biol Chem, 1998, 273, 3132-3135

163) **Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A,** Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes, Endocrine Reviews, 2002, 23(2), 201-229

164) **Boden G,** Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM , Diabetes, 1997, 46, 3-10.

165) **Lam, TKT, Van de Werve G, Giacca A,** Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, E281-E290

166) **Bergman RN,** Pathogenesis and Prediction of Diabetes Mellitus, The Mount Sinai Journal of Medicine, 2002, 69 (5), 280-290

167) **Zammit VA,** Insulin Stimulation of Hepatic Triacylglycerol Secretion in the Insulin-Replete State : Implications fot the Etiology of Peripheral Insulin Resistance, 2002, Ann N Y Acad Sci, 967, 52-65

168) **Frayn KN,** Adipose tissue and the insulin resistance syndome, Proceedings of the Nutrition Society, 2001, 60, 375-380

169) **Zilversmit DB,** Atherogenesis: a postprandial phenomenon, Circulation, 1979, 60(3), 473-85

170) **Beucler I, Turpin G**, Le métabolisme des lipoprotéines athérogènes, Ann Med Interne, 2001, 152, 3, 158-161

171) **Kugiyama K, Doi H, Takazoe K, Kawano H, Soejima H, Mizuno Y, Tsunoda R, Sakamoto T, Nakano T, Nakajima K, Ogawa H, Sugiyama S, Yoshimura M, Yasue H,** Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease, Circulation, 1999, 99(22), 2858-60

172) **McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ,** Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study, Atherosclerosis, 2001, 154(1), 229-36

173) **Bjorkegren J, Silveira A, Boquist S, Tang R, Karpe F, Bond MG, de Faire U, Hamsten A,** Postprandial enrichment of remnant lipoproteins with apoC-I in healthy normolipidemic men with early asymptomatic atherosclerosis, Arterioscler Thromb Vasc Biolm, 2002, 22(9), 1470-4

174) **Marcoux C, Hopkins PN, Wang T, Leary ET, Nakajima K, Davignon J, Cohn JS,** Remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels of hypertriglyceridemic patients in the fed and fasted state, J Lipid Res, 2000, 41(9), 1428-36

175) **Funada J, Sekiya M, Otani T, Watanabe K, Sato M, Akutsu H,** The close relationship between postprandial remnant metabolism and insulin resistance, Atherosclerosis, 2004, 172(1), 151-4

176) **Ohnishi H, Saitoh S, Takagi S, Ohata J, Isobe T, Kikuchi Y, Takeuchi H, Shimamoto K,** Relationship between insulin-resistance and remnant-like particle cholesterol, Atherosclerosis, 2002, 164(1), 167-70

177) **E Levy, M Zoltowska**, Prolonged post-pradial increment in obese subjects with intra-abdominal visceral fat acumulation, Eur J Clin Invest, 1999, 29, 271-273

178) **Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Mamo JC, Redgrave TG,** Markers of triglyceride-rich lipoprotein remnant metabolism in visceral obesity, Clin Chem. 2002, 48(2), 278-83

179) **James AP, Watts GF, Barrett PH, Smith D, Pal S, Chan DC, Mamo JC,** Effect of weight loss on postprandial lipemia and low-density lipoprotein receptor binding in overweight men, Metabolism, 2003, 52(2), 136-41

180) **Ai M, Tanaka A, Ogita K, Sekine M, Numano F, Numano F, Reaven GM,** Relationship between hyperinsulinemia and remnant lipoprotein concentrations in patients with impaired glucose tolerance, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(10), 3557-60

181) **Mero N, Syvanne M, Taskinen M-R**, Postprandial lipid metabolism in diabetes, Atherosclerosis, 1998, 141 Suppl 1, S53-S55

182) **Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, Wilson PW; Framingham Offspring Study,** Elevated remnant-like particle

cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study, Diabetes Care, 2002, 25(6), 989-94

183) **Chan DC, Watts GF, Barrett PH, O'Neill FH, Redgrave TG, Thompson GR,** Relationships between cholesterol homoeostasis and triacylglycerol-rich lipoprotein remnant metabolism in the metabolic syndrome, Clin Sci (Lond), 2003, 104(4), 383-8

184) **Cohn JS, Marcoux C, Davignon J**, Detection, Quantification, and Characterization of Potentially Atherogenic Triglyceride-Rich Remnant Lipoproteins, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19, 2474-2486

185) **Yu KC, Cooper AD**, Postprandial lipoproteins and atherosclerosis, Front Biosci, 2001, 6, D332-54

186) **Pruneta-Deloche V, Sassolas A, Dallinga-Thie GM, Berthezene F, Ponsin G, Moulin P**. Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes, J Lipid Res, 2004

187) **Panarotto D, Remillard P, Bouffard L, Maheux P,** Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner, Eur J Clin Invest, 2002, 32(2), 84-92

188) **Frayn KN**, Non-esterified datty acid metabolism and postprandial lipaemia, Atherosclerosis, 1998, 141 Suppl. 1, S41-46

189) **Avramoglu RK, Qiu W, Adeli K**, Mechanisms of metabolic dyslipidemia in insulin resistant States: deregulation of hepatic and intestinal lipoprotein secretion, Front Biosci, 2003, 8, D464-76

190) **Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Sinnett D, Kalman R, Garofalo C, Seidman E, Levy E,** Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in Psammomys obesus: a model of insulin resistance and type 2 diabetes, Diabetes, 2003, 52(10), 2539-45

191) **Murphy MH, Nevill AM, Hardman AE,** Different patterns of brisk walking are equally effective in decreasing postprandial lipaemia, Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 10, 1303-9

192) **Herd SL, Hardman AE, Boobis LH, Cairns CJ,** The effect of 13 weeks of running training followed by 9 d of detraining on postprandial lipaemia, Br J Nutr, 1998, 80(1), 57-66

193) **Koutsari C, Hardman AE**, Exercise prevents the augmentation of postprandial lipaemia attributable to a low-fat high-carbohydrate diet, Br J Nutr, 2001, 86(2), 197-205

194) **Williams CM**, Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance, Atherosclerosis, 1998, 141 Suppl. 1, S87-92

195) **Williams CM**, Postprandial lipid metabolism: effects of dietary fatty acids, Proc Nutr Soc, 1997, 56, 679-92

196) **Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R,** Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitionning, and Glucolipotoxicity; Role in β-Cell Adaptation and Failure in the Etiology Diabetes , Diabetes, 2002, 51 (Suppl. 3), S405-S413

197) **Poitout V, Robertson PP**, Secondary β-Cell Failure in Type 2 Diabetes – A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity, Endocrinology, 2002, 143, 339-342

198) **Corkey BE, Deeney JT, Yaney GC, Tornheim K, Prentki M,** The Role of Long-Chain Fatty Acyl-CoA Esters in β-Cell Signal Transduction, J Nutr, 2000, 130, S299-S304

199) **Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A,** Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes, Endocrine Reviews, 2002, 23(2), 201-229

200) **Prentki M, Tornheim K, Corkey BE,** Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion, Diabetologia, 1997, 40, S32-S41

201) **Prentki M, Corkey BE**,Are the β-Cell Signaling Molecules Malonyl-CoA and Cytosolic Long-Chain Acyl-CoA Implicated in Multiple Tissue Defects of Obesity and NIDDM?; Diabetes, 1996, 45, 273-283

202) **Deeney JT, Prentki M, Corkey BE,** Metabolic control of β-cell function, Seminars in Cell and Developmental Biology, 2000, 11, 267-275

203) **Dunphy JT, Linder ME,** Signalling functions of protein palmitoylation, Biochim Biophys Acta, 1998, 1436, 245-261

204) **Resh MD,** Fatty acylation of protein : new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins, Biochim Biophys Acta, 1999, 1451, 1-16

205) **Girard J,** Acides gras et cellule β, Diabetes Metab, 2000, 26, 6-9

206) **Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A,** β-Cell Adaptation and Decompensation During the Progression of Diabetes, 2001, 50, S154-S159

207) **Bernard-Kargar C, Ktorza A,** Endocrine Pancreas Plasticity Under Physiological and Pathological Conditions, Diabetes, 2001, 50, S30-S35

208) **Shimabukuro M, Zhou Y-T, Levi M, Unger RH,** Fatty acid-induced β cell apoptosis : A link between obesity and diabetes, Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95, 2498-2502

209) **Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA,** Ceramide in apoptosis : an overview and current perspectives , Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1585, 114-125

210) **Pipeleers D, Hoorens A, Marichal-Pipeleers M, Van de Casteele M, Boouwens L, Ling Z,** Role of Pancreatic β-Cells in the Process of β-Cell Death, Diabetes, 2001, 50 (Suppl. 1), S52-S57

211) **Unger RU, Zhou YT,** Lipotoxicity of β-Cells in Obesity and in Other Causes of Fatty Acid Spillover, Diabetes, 2001, S118-S121

212) **Liaudet L, Soriano FG, Szabo C,** Biology of nitric signaling, Crit Care Med, 2000, 28, N37-N52

213) **Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S,** Relation between antioxydant enzyme gene expression and antioxydative defense status of insulin-producing cells, Diabetes, 1997, 46, 1733-1742

214) **Poulsen T-M**, β-Cell Apoptosis; Stimuli and Signaling, Diabetes, 2001, 50, S58-S63

215) **Hayden MR, Tyagi SC,** Islet Redox Stress: The Manifold Toxicities of Insulin Resistance, Metabolic Syndrome and Amylin Derived Islet Amyloid in Type 2 Diabetes Mellitus, J Pancreas, 2002, 3, 86-108

216) **Irshad M, Chaudhuri PS,** Oxidant-antioxydant system: role and significance in human body, Indian J Exp Biol, 2002, 40, 1233-9

217) **Bakker SJL, Ijzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans ROB, Heine RJ**, Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity : the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and β-cell failure ?, Atherosclerosis, 2000, 148, 17-21

218) **Azzone GF, Schmehl I, Canton M, Luvissetto S,** The effect of the protonmotive force on the redox state of mitochondrial cytochromes, Biochim Biophys Acta, 1994, 1187, 140-144

219) **Skulachev VP,** Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants, Q Rev Biophys, 1996, 29, 169-202

220) **Boveris A,** Determination of the production of superoxyde radicals and hydrogen peroxide in mitochondria, Methods Enzymol, 1984, 105, 429-435

221) **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM,** Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways : A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes, Endocrine Reviews, 2002, 23, 599-622

222) **Halliwell B**, Antioxydant caracterisation. Methodology and mechanism, Biochem Pharmacol, 1995, 49, 1341-1348

223) **Evans JL, Goldfine BA, Grodsky GM**, Are Oxidative Stress – Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β-Cell Dysfunction?, Diabetes, 2003, 52, 1-8

224) **Mercurio F, Manning AM**, NF-κB as a primary regulator of the stress response, Oncogene, 18, 6163-6171

225) **Barnes PJ, Karin M**, Nuclear factor-κB : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, N Engl J Med, 1997, 336, 1066-1071

226) **Yuan M, Lee J, Konstantopoulos N, Hansen L, Shoelson SE,** Salicylate inhibition of IKKβ (IκB kinase) reverses insulin resistance in Zucker (fa/fa) rats. Diabetes, 2000, 49 (Suppl. 1) , A292

227) **Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE,** Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKKβ, Science, 2001, 293, 1673-1677

228) **Basu S, Kolesnick R**, Stress signals for apoptosis : ceramide and c-Jun kinase, Oncogene, 1998, 17, 3277-3285

229) **Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG**, Signal transduction through MAP kinase cascades. In : Woude GFV, Klein D, eds. Advances in cancer research. San Diego : Academic Press Inc., 74, 49-139

230) **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y,** A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamemebrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation, J Biol Chem, 1997, 272, 29911-29918

231) **Wojtczak L, Schonfeld P,** Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria , Biochim Biophys Acta, 1993, 1183, 41-57

232) **Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patane G, Rabuazzo AM, Vigneri R, Purello M, Purello F,** Chronic Exposure to Free Fatty Acids or High Glucose Induces Apoptosis in Rat Pancreatic Islets : Possible Role of Oxidative Stress, Metabolism, 2002, 51 (10), 1340-1347

233) **Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M,** Low antioxydant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues, Free Radic Biol Med, 1996, 20, 463-466.

234) **Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ,** Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure?, Atherosclerosis. 2000, 148(1), 17-21

235) **Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, Bayerle-Eder M, Roden M, Wolzt M**, FFA-Induced Endothelial Dysfunction Can Be Corrected by Vitamin C, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87, 2913-2917

236) **Gopaul NK, Manraj MD, Hebe A, Lee Kwai Yan S, Johnston A, Carrier MJ, Anggard EE**, Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin

resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism, Diabetologia, 2001, 44, 706-712

237) **Evans JL, Goldfine ID**, α-Lipoic acid : a multi-functional antioxydant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes, Diabetes Technol Ther, 2000, 2, 401-413

238) **Jouven X, Charles MA, Desnos M, Dicumetiere P**, Circulating non-esterified fatty acid level as a predictive risk factor for sudden death in the population, Circulation, 2001, 104, 756-761

239) **Stojilikovic MP, Lopes HF, Zhang D, Morrow JD, Goodfriend TL, Egan BM**, Increasing plasma fatty acids elevated F2-isoprostanes in humans : implications for the cardiovascular risk factor cluster, J Hypertens, 2002, 20, 1215-1221

240) **Penckofer S, Schwertz D, Florczak K,** Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants, J Cardiovasc Nurs. 2002, 16(2), 68-85

241) **Vessby B,** Dietary fat and insulin action in humans, British Journal of Nutrition, 2000, 83, S91-S96

242) **Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nalsen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH; KANWU Study,** Substituing dietary for monoinsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women : the KANWU study, 2001, Diabetologia, 44, 312-319

243) **Parker DR, Weiss ST, Troisi R, Cassano PA, Vokonas PS, Landsberg L,** Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations : the Normative Aging Study, Am J Clin Nutr, 58, 129-136

244) **Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL,** Diet composition and insulin action in animal models, British Journal of Nutrition, 2000, 83, S85-S90

245) **Clarke SD,** Polyinsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription : A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome, J Nutr, 2001, 131, 1129-1131

246) **Clarke SD,** Polyinsaturated fatty acid regulation of gene transcription :a mechanism to improve energy balance and insulin resistance, 2000, 83, S59-S66

247) **Vanden Heuvel JP,** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: A Critical Link among Fatty Acids, Gene Expression and Carcinogenesis, J Nutr, 1999, 129, S575-S580

248) **Clarke SD, Gasperikova D, Nelson C, Lapillonne A, Heird WC,** Fatty Acid Regulation of Gene Expression; A Genomic Explanation for the Benefits of the Mediterranean Diet, Ann N Y Acad Sci, 2002, 967, 283-298

249) **Borkman M, Chisholm DJ, Furler SM, Storlien LH, Kraegen EW, Simons LA, Chesterman CN**, Effects of fish oil supplementation on glucose and lipid metabolism in NIDDM, Diabetes, 1989, 38, 1314-1319

250) **Annuzzi G, Rivellese A, Capaldo B, Di Marino L, Iovine C, Marotta G, Riccardi G,** A controlled study on the effects of ω-3 fatty acids on lipid and glucose metabolism in non-insuin dependent diabetic patients, Atherosclerosis, 1991, 87, 65-73

251) **Rivellesse AA, Maffettone A, Iovine C, Di Marino L, Annuzzi G, Mancini M, Riccardi G,** Long-Term Effects of Fish Oil on Insulin Resistance and Plasma Lipoproteins in NIDDM Patients With Hypertriglyceridemia, Diabetes Care, 1996, 19 (11), 1207-1213

252) **Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nalsen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH; KANWU Study** Sustituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women : the Kanwu study, Diabetologia, 2001, 44, 312-319

253) **Jensen J, Bysted A, Dawids S, Hermansen K, Holmer G,** The effect of palm oil, lard, and puff-pastry margarine on postprandial lipid and hormone responses in normal weight and obese young women, British J of Nutriton, 1999, 82, 469-479

254) **Vessby B, Tengblad S, Lithell H**, Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-yaer-old men, Diabetologia, 1994, 37, 1044-1050

255) **Pelikanova T, Kazdova L, Chvojkova S, Bas J**, Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients, Metabolism, 2001, 50, 1472-1478

256) **Laaksonen DE, Lakka TA, Lakka H-M, Nyyssonen K, Rissanen T, Niskanen LK, Salonen JT**, Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycaemia and diabetes in middle-aged men, Diabetic Med, 2002, 19, 456-464

257) **Mayer-Davis EJ, Monaco JH, Hoen HM,** Dietary fat and insulin sensitivity in a triethnic population : the role of obesity – the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS), Am J Clin Nutr, 65, 79-87

258) **Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Gomez P, Paz-Rojas E, Montilla P, Marin C, Velasco MJ, Blanco-Molina A, Jimenez Pereperez JA, Ordovas JM,** A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons, Diabetologia, 2001, 44, 2038-2043

259) **Hu FB, Van Dam RM, Liu S,** Diet and risk of Type II diabetes : the role of types of fat and carbohydrates Diabetologia, 2001, 44, 805-817

260) **Vessby B, Gustafsson I-B, Tengblad S, Boberg M, Andersson A,** Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action, 2002, Ann. N. Y. Acad Sci, 967, 83-195

261) **Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, DeLany JP, Bray GA, Lefevre M, Denkins YM, Rood JC,** Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and women with a range of glucose tolerance, Metabolism, 2001, 50(1), 86-92

262) **Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV,** The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids, N Engl J Med, 1993, 328, 238-244

263) **Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW,** Effect of conjugated linoleic acid on body compositition in mice, Lipids, 1997, 32, 853-858

264) **Smedman A, Vessby B,** Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects, Lipids, 2001, 36(8), 773-81

265) **Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim KJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O,** Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice, Diabetes, 2000, 1534-1542

266) Belury MA, Dietary Conjugated Linoleic Acid in Health:Physiological Effects and Mechanisms of Action, Annu Rev Nutr, 2002, 22, 505-31

267) **Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D,** Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice, Anticancer Res, 1998, 3A,1429-34

268) **Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW,** Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid, Cancer Res, 1991, 51(22), 6118-24

269) **Liew C, Schut HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH,** Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms, Carcinogenesis, 1995,12, 3037-43

270) **Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ**, Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters, Artery, 1997, 22(5), 266-77

271) **Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR, Houseknecht KL,** Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid : improved glucose tolerence, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression, Diabetes, 2001, 50, 1149-1157

272) **Chin S, Lui W, Storkson J, Ha Y, Pariza M,** Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens, J Food Comp Anal, 1992, 5, 185-197

273) **Riserus U, Arner P, Brismar K, Vessby B,** Treatment With Dietary trans 10 cis 12 Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Specific Insulin Resistance in Obese Men With the Metabolic Syndrome, Diabetes Care, 2002, 25, 1516-1521

274) **Riserus U, Berglund L, Vessby B,** Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial, Int J Obes Relat Metab Disord, 2001 25(8), 1129-3

275) **Riserus U, Smedman A, Basu S, Vessby B,** CLA and body weight regulation in humans, Lipids, 2003, 38(2), 133-7

276) **Riserus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikton G N, Arnlov J, Vessby B,** Supplementation With Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Dependent Oxidative Stress and Elevated C-Reactive protein, Circulation, 2002, 106, 1925-1929

277) **Warne JP**, New perspectives on endocrine signalling : Tumor necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass, Journal of endocrinology, 2003, 177, 351-355

278) **MacDougald OA, Mandrup S**, Adipogenesis :forces that tip the scales, Trends in Endocrinology and Metabolism, 2002, 13, 5-11

279) **Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP**, Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells, Diabetes, 46, 1939-1944

280) **Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J**, Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture, Diabetologia, 1995, 38, 764-771

281) **Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS**, Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of inracellular cAMP, Diabetes, 2002, 51, 2029-2935

282) **Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelamn BM,** IRS-1 mediated inhibition of insulin-receptor tyrosine kinase activity in TNF-α and obesity induced insulin resistance, Science, 1996, 271, 665-668

283) **Moller DE**, Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes, Trends Endocrinol Metab, 2000, 11, 212-217

284) **Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, DeFronzo RA**, Tumor necrosis factor α and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients, International Journal of Obesity, 2003, 27, 88-94

285) **Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM,** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis-alpha in human obesity and insulin resistance, J Clin Invest, 1995, 95, 2409-2415

286) **Kern P, Saghizadeh M, Ong J, Bosch R, Deem R, Simsolo R,** The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase, J Clin Invest, 1995, 95, 2111-2119

287) **Kieffer TJ, Habener JF,** The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 278(1), E1-E14

288) **Harris RB,** Leptin--much more than a satiety signal, Annu Rev Nutr, 2000, 20, 45-75

289) **Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF,** Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator, Eur J Endocrinol, 2000, 143(3), 293-311

290) **Barbier M, Attoub S, Galmiche J-P**, La leptine: aspects physiologiques et implications en Hépat-Gastroentérologie, Gastrenterol Clin Biol, 2000, 24, 506-519

291) **Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA,** Leptin, a review of its peripheral actions and interactions, Intern J Obes, 2002, 26, 1407-1433

292) **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA,** The hormone resistin links obesity to diabetes, Nature. 2001, 409(6818), 307-12

293) **Steppan CM, Lazar MA**, Resistin and obesity-associated insulin resistance, Trends Endocrinol Metab, 2002, 1, 18-23

294) **Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS,** A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation, J Biol Chem, 2001, 276(14), 11252-6

295) **Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G,** Do resistin and resistin-like molecules also link obesity to inflammatory diseases?, Ann Intern Med, 2001,135(4), 306-7

296) **Smith U**, Resistin – Resistant to defining its role, Obesity Res, 2002, 10, 61-62

297) **Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA,** A family of tissue-specific resistin-like molecules, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(2), 502-6

298) **Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ,** The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin : functional implications, Gene, 2003, 305, 27-34

299) **Banerjee RB, Lazar MA,** Resistin : molecular history and prognosis, J Mol Med, 2003, 81, 218-226

300) **Nagaev I, Smith U**, Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle », Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285, p. 561-564

301) **Savage DB, SewterCP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Costidine RV, O'Rahilly S,** Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxysome proliferator-activated receptor-gamma action in humans, Diabetes, 2001, 50, 2199-2202

302) **Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM,** Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance, Obesity Research, 2002, 10, 1-5

303) **Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Rauseo A, Bozzali M, Vigneri R, Dallapiccola B, Trischitta V, Frittitta L,** An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87, 4403-4406

304) **Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC**, Human resistin gene : molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87, 2520-2524

305) **Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, Argyropoulos G**, A Promoter Genotype and Oxidative Stress Potentially Link Resistin to Human Insulin Resistance, Diabetes, 2003, 52, 1611-1618

306) **Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA,** Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin res istance in pioglitazone-treated type II diabetic patients, Int J Obes Relat Metab Disord. 2004, 28(6), 783-9

307) **Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS**, Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists, J Biol Chem, 2001, 276(28), 25651-3

308) **Beltowski J**, Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue, Med Sci Monit, 2003, 9(2), RA55-RA61

309) **Ukkola O, Santaniemi M,** Adiponectin : a link between excess adiposity and associated comorbidities, J Mol Med, 2002, 80, 696-702

310) **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y,** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, Biochem Biophys Res Commun, 1999, 257, 79-83

311) **Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K,** cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apMi (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221, 286-289

312) **Shapiro L, Scherer PE,** The crystal structure of a complement –1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor, Curr Biol, 1998, 8, 335-338

313) **Scherer PE, Williams S, Fogliano M et al,** « A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, J Biol Chem, 1995, 270, 26746-26749

314) **Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM,** Secretion of adiponectin and regulation of apMl gene expression in human visceral adipose tissue, Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288,1102 – 1107

315) **Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y,** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein, Diabetes, 2001, 50, 2094-2099

316) **Moore GB, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA, Clapham JC,** Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice, Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286, 735-741

317) **Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF**, A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, J Biol Chem, 1995, 270, 26746-26749

318) **Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni,** Plasma Adiponectin Concentrations in Children : Relationships with Obesity and Insulinemia, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 87, 10, 4652-4656

319) **Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al**, Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes : close association with insulin resistance and hyperinsulinemia, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86, 1930-1935

320) **Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y,** Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20, 1595-1599

321) **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T**, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity, Nat Med, 2001, 7, 941-946

322) **Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L**, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30, J Clin Invest, 2001, 198, 1875-1881

323) **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y**, Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway, Circulation, 2000, 102, 1296-1301

324) **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y**, Novel modulator for endothelial adhesion molecules : adipocyte-derived plasma protein adiponectin , Circulation, 1999, 100, 2473-2476

325) **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y,** Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages, Circulation, 2001, 103, 1057-1063

326) **Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W,** Interleukin 6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects, J Clin Endocrinol, 2000, 85, 1334-1339

327) **Fernandez-Real JM, Ricart W,** Insulin Resistance and Chronic Cardiovascular Inflammatory Syndrome, Endocrine Reviews, 2003, 24(3), 278-301

328) **Orban Z, Remaley A, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP**, The differential effect of food intake and β – adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man, J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84, 2126-2133

329) **Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW**, Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-α, *in vivo*, J Clin Endocrinol Metab,1997, 82, 4196-4200

330) **Papanicolaou DA, Petrides JS, Tsigos C, Bina S, Kalogeras KT, Wilder R, Gold PW, Deuster PA, Chrousos GP,** Exercice stimulates interleukin-6 secretion : inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines, Am J Physiol, 1996, 271, E601-E605

331) **Lowe GDO, Rumley A,** Coagulation, fibrinolysis and cardiovascular disease », Fibrinolysis Proteolysis, 1999, 13, 91-98

332) **Takano M, Itoh N, Yayama K, Yamano M, Ohtani R, Okamoto H,** Interleukin 6 as a mediator responsible for inflammation-induced increase in plasma angiotensinogen, Biochem Phamacol, 2000, 45, 201-206

333) **Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C,** Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats, Endocrinology, 1995, 136, 2143-2149

334) **Bastard J-P, Maachi M, Tran Van Nhieu J, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert J-J, Capeau J, Hainque B,** Adipose Tissue IL-6 Content Correlates with Resistance to Insulin Activation of Glucose Uptake both in Vivo and in Vitro, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87, 2084-2089

335) **Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA,** High white blood cell count is associated with a worsenong of insulin sensitivity and predicts the developpement of type 2 diabetes, Diabetes, 2002, 51, 455-461

336) **Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Burin JE, Ridker PM,** C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus, JAMA, 2001, 286, 327-334

337) **Southern C, Schulster D, Green IC,** Inhibition of insulin secretion from rats islets of Langerhans by interleukin-6 , Biochem J, 1990, 272, 243-245

338) **Sandler S, Bendtzen K, Eizirik D, Welsh M,** Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro, Endocrinology, 1990, 126, 1288-1294

339) **Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadia CS, Chrousos GP**, Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation , J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82, 4167-4170

340) **Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA,** Interleukin-6 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes, Diabetes, 2002, 513391-3399

341) **Hertzel AV, Bernlohr DA,**The Mammalian Fatty Acid-binding Protein Multigene Family: Molecular and Genetic Insights into Function, TEM, 2000, 11 (5), 175-180

342) **Woolf BT, Tychko M,** Simulations of Fatty Acid-Binding Proteins. II. Sites for Discrimination of Monounsatirated Ligands, Biophysical Journal, 1998, 74, 694-707

343) **Storch J, Thumser AEA**, The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins, Biochim Biophys Acta, 2000, 1486, 28-44

344) **Dube N, Delvin E, Yotov W, Garofalo C, Bendayan M, Veerkamp JH, Levy E,** Modulation of Intestinal and Liver Fatty Acid-Binding Proteins in Caco-2 Cells by Lipids, Hormones and Cytokines, J Cell Biochem, 2001, 81, 613-620

345) **Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M**, An Amino Acid Substitution in the Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein Is Associated with Increased Fatty Acid Binding, Increased Fat Oxidation, and Insulin Resistance, J Clin Invest, 1995, 95, 1281-1287

346) **Baier LJ, Bogardus C, Sacchettini JC,** A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells, J Biol Chem, 1996, 271, 10892-10896

347) **Georgopoulos A, Aras O, Tsai M.Y.** Codon-54 Polymorphism of the Fatty Acid-Binding Protein 2 Gene Is Associated with Elevation of Fasting and Postprandial Triglyceride in Type 2 Diabetes, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, 3155-3160

348) **Prochazka M, Lillioja S, Tait JF, Knowler WC, Mott DM, Spraul M, Bennett PH, Bogardus C,** Linkage of Chromosomal Markers on 4q With a Putative Gene Determining Maximal Insulin Action in Pima Indians, Diabetes, 1993, 42, 514-519

349) **Pratley RE, Baier L, Pan DA, Salbe AD, Storlien L, Ravussin E, Bogardus C**, Effects of an Ala54THR polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein on responses to dietary fat in humans, J Lipid Res, 2000, 41, 2002-2008

350) **Boullu-Sanchis S, Lepretre F, Hedelin G, Donnet JP, Schaffer P, Froguel P, Pinget M,** Type 2 Diabetes Mellitus: Association Study of Five Candidate Genes in an Indian Population of Guadeloupe, Genetic Contribution of FABP2 Polymorphism, 1999, 25, 150-156

351) **Hegele RA, Connelly PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B,** Common Genomic Variation in the APOC3 Promoter Associated With Variation in Plasma Lipoproteins, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 2753-2758

352) **Hegele RA, Connelly PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B,** Common Genomic Variants Associated With Variation in Plasma Lipoproteins in Young Aboriginal Canadians, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 1060-1066

353) **Hegele RA, Young TK, Connelly PW**, Are Canadian Inuit at increased genetic risk for coronary heart diseasse?, J Mol Med, 1997, 75, 364-370

354) **Yagi T, Nishi S, Hinata S, Murakami M, Yoshimi T**A, Population association study of four candidate genes (hexokinase II, glucagon-like peptide 1 receptor, fatty acid binding protein-2, and apolipoportein C-II) with type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Japanese subjects, Diabet Med, 1996, 13, 902-907

355) **Ito K, Nakatani K, Fujii M, Katsuki A, Tsuchihashi K, Murata K, Goto H, Yano Y, Gabazza EC, Sumida Y, Adachi Y**, Codon 54 polymorphism of the fatty acid binding protein gene and insulin resistance in the Japanese population, Diabet Med, 1999, 16, 119-124

356) **Hayakawa T, Nagai Y, Nohara E,** Variation of the Fatty Acid Binding Protein 2 Gene IS Not Associated With Obesity and Insulin esistance in Japanese Subjects.; Metabolism, 1999, 48, 655-657

357) **Endo K, Yanagi H, Hirano C, Hayakawa, Hamaguchi H, Tomura S,**No association found between the Ala54Thr polymorphism of FABP-2 gene and obesity and obesity with dyslipidemia in Japanese school children, J Atheroscler Thromb, 2001, 8 (3), 80-83

358) **Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Koyama K, Ichikawa F, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K**, Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men, Diabetologia, 1997, 40, 706-710

359) **Humphreys P, McCarthy M, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Stratton I, Morgan R, Rees A, Owens D, Stengard J, Nissinen A**, Chromosome 4q Locus Associated With Insulin Resistance in Pima Indians, Diabetes, 1994, 43, 800-804

360) **Saarinen L, Pulkkinen A, Kareinen A,** Variants of the Fatty Acid-Binding Protein 2 Gene Are Not Associated With Coronary Heart Disease in Nondiabetic Subjects and in Patients With NIDDM, Diabetes Care, 1998, 21 (5), 849-850

361) **Vidgren HM, Sipilainen RH, Heikkinen S,** Threonine allele in codon 54 of the fatty acid binding protein 2 gene does not modify the fatty acid composition of serum lipids in obese subjects, European Journal of Cinical Investigation, 1997, 27, 405-408

362) **Sipilainen R, Uusitupa M, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M,** Variants in the Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein 2 Gene in Obese Subjects, J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82, 2629-2632

363) **Pihlajamaki J, Rissanen J, Heikkinen S, Karjalainen L, Laakso M,** Codon 54 Polymorphism of the Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein 2 Gene Is Associated With Dyslipidemias But Not With Insulin Resistance in Patients With Familial Combined Hyperlipidemia, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 1039-1044

364) **Agren JJ, Valve R, Vidgren H, Laakso M, Uusitupa M,** Postprandial Lipemic Response Is Modified by the Polymorphism at Codon 54 of the Fatty Acid-Binding Protein 2 Gene, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18, 1606-1610

365) **Chiu KC, Chuang L-M, Yoon C,** The A54T polymorphism at the intestinal fatty acid binding protein 2 is associated with insulin resistance in glucose tolerant Caucasians, BMC Genetics, 2001, 2-7

366) **Chiu KC, Chuang LM, Chu A, Yoon C,** Fatty acid binding protein 2 and insulin resistance, Eur J Clin Invest, 2001, 31 (6), 521-527

367) **Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Almgren P, Groop LC,** The T 54 Allele of the Intestinal Fatty Acid Binding Protein 2 Is Associated with a Parental History of Stroke, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, 2801-2804

368) **Galluzzi JR, Cupples LA, Meigs JB, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM; Framingham Offspring Study**, Association of the Ala54-thr Polymorphism in the Intestinal Fatty Acid-Binding Protein With 2-h Postchallenge Insulin Levels in the Framingham Offspring Study, Diabetes Care, 2000, 24(7), 1161-1166

369) **Tahvanainen E, Molin M, Vainio S,** Intestinal fatty acid binding protein polymorphism at codon 54 is not associated with postprandial responses to fat and glucose tolerance tests in healthy young Europeans. results from EARS II participants, Atherosclerosis, 2000, 152, 317-325

370) **Clement K, Dina C, Basdevant A, Chastang N, Pelloux V, Lahlou N, Berlan M, Langin D, Guy-Grand B, Froguel P**, A Sib-Pair Analysis Study of 15 Candidate Genes in French Families With Morbid Obesity - Indication for Linkage With Islet 1 Locus on Chromosome 5q, Diabetes, 1999, 48, 398-402

371) **Lei H-H, Coresh J, Shuldiner AR, Boerwinkle E, Brancati FL,** Variants of the Insulin Receptor Substrate-1 and Fatty Acid Binding Protein 2 Genes and the Risk of Type 2 Diabetes, Obesity, and Hyperinsulinemia in African-Americans; The Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1999, Diabetes, 48, 1868-1872

372) **Hegele R A, Wolever TMS, Story JA, Connelly PW, Jenkins DJA,** Intestinal fatty acid-binding protein variation associated with variation in the response of plasma lipoproteins to dietary fibre, European Journal of Clinical Investigation, 1997, 27, 857-862

373) **Hegele RA,** A Review of Intestinal Fatty Acid Binding Protein Gene Variatiopn and the Plasma Lipoprotein Response to Dietary Components, Clinical Biochemistry, 1998, 31 (8), 609-612

374) **Georgopoulos A, Aras O, Noutsou M, Tsai M Y,** Unlike Type 2 Diabetes, type 1 Does Not Interact with the Codon 54 Polymorphism of the Fatty Acid Binding Protein 2 Gene, J Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002, 87 (8), 3735-3739

375) **Jamil H, Dickson JK Jr, Chi CH, Lago MW, Rinehart JK, Biller SA, Gregg RE, Watterau JR,** Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport, J Biol Chem, 1995, 270, 6549-6554

376) **Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma M-E, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE,** Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinaemia, Science, 1992, 999-1001

377) **Wetterau JR, Lin MCM, Jamil H,** Microsomal triglyceride transfer protein, Biochim Biophys Acta, 1997, 1345, 136-150

378) **Sharp D, Blinderman L, Combs K A, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil C M, Turck CW, Bouma M-E, Rader DJ, Aggerbeck LP, Gregg RE, Gordon DA, Wetterau JR,** Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia, Nature, 1993, 365(6441), 65-9

379) **Narcisi TM, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB, Grantham TT, Fox MF, Povey S, de Bruin TW**, Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia, Am J Hum Genet, 1995, 57(6),1298-310

380) **Gordon DA, Jamil H,** Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly, Biochim Biophys Acta, 2000,1486, 72-83

381) **Davis RA,** Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver, 1999, 1440, 1-31

382) **Ledmyr H, Karpe F, Lundahl B, McKinnon M, Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E,** Variants of the microsomal triglyceride transfer protein gene are associated with plasma cholesterol levels and body mass index, J lipid Res, 2002, 43, 51-58

383) **Herrmann SM, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Arveiler D, Bao-Sheng C, Cambien F,** Identification of two polymorphisms in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene: lack of association with lipoprotein profiles, J Lipid Res, 1998, 39, 2432-2435

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

385) **Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ** Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglyceride and apolipoprotein B, 1999, 20, 2134-2139

386) **Juo SH, Han Z, Smith JD, Colangelo L, Liu K,** Common Polymorphism in Promoter of Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Influences Cholesterol, ApoB, and Triglyceride Levels in Young African American Men, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20, 1316-1322

387) **Couture P, Otvos JD, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM.** Absence of association between genetic variation in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein gene and plasma lipoproteins in the Framingham Offspring Study, Atherosclerosis, 2000, 148, 337-343

388) **Ledmyr H, McMahon AD, Ehrenborg E, Nielsen LB, Neville M, Lithell H, MacFarlane PW, Packard CJ, Karpe F; WOSCOPS executive,** The microsomal triglyceride transfer protein gene-493T variant lowers cholesterol but increases the risk of coronary heart disease, Circulation, 2004, 109(19), 2279-84

389) **St-Pierre J, Lemieux I, Miller-Felix I, Prud'homme D, Bergeron J, Gaudet D, Nadeau A, Despres JP, Vohl MC,** Visceral obesity and hyperinsulinemia modulate the impact of the microsomal triglyceride transfer protein -493G/T polymorphism on plasma lipoprotein levels in men, Atherosclerosis, 2002, 160(2), 317-24

390) **Bjorn Lundahl, Leren TP, Ose L, Hamsten A, Karpe F,** A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein

(MTP -493G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(7), 1784-8

391) **Han Z, Heath SC, Shmulewitz D, Li W, Auerbach SB, Blundell ML, Lehner T, Ott J, Stoffel M, Friedman JM, Breslow JL,** Candidate genes involved in cardiovascular risk factors by a family-based association study on the island of Kosrae, Federated States of Micronesia, Am J Med Genet, 2002, 110(3), 234-42

392) **Watts GF, Riches FM, Humphries SE, Talmud PJ, van Bockxmeer FM.** Genotyping associations of the hepatic secretion of VLDL apolipoprotein B-100 in obesity, J Lipid Res, 2000, 41, 481-488

393) **Chen L, Yoshino G, Maeda E, Zeng S**, Effect of microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism in the promoter region on dyslipidemia in type 2 diabetic subjects, Chin Med J (Engl), 2003,116(2), 215-7

394) **Phillips C, Mullan K, Owens D, Tomkin GH**, Microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms and lipoprotein levels in type 2 diabetes, QJM, 2004 97(4), 211-8

395) **Chen SP, Tan KC, Lam KS**, Effect of the microsomal triglyceride transfer protein -493 G/T polymorphism and type 2 diabetes mellitus on LDL subfractions, Atherosclerosis, 2003, 167(2), 287-92

396) **Bernard S, Touzet S, Personne I, Lapras V, Bondon PJ, Berthezene F, Moulin P,** Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with Type II diabetes, Diabetologia, 2000, 43, 995-999

397) **Ballantyne CM,** Low-Density Lipoproteins and Risk for Coronary Artery Disease, Am J Cardiology, 1998, 82, 3Q-12Q

398) **Griffin BA**, Lipoprotein atherogenicity : an overview of current mechanisms, Proceedings of the Nutrition Society, 1999, 58, 163-169

399) **Sniderman AD**, How, When and Why to Use Apolipoprotein B in Clinical Practice, Am J Cardiol, 2002, 90 (Suppl), 48i-54i

400) **Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M,** Structure of low density lipoprotein (LDL) particles : Basis for understanding molecular changes in modified LDL, Biochimica et Biphysica Acta, 2000, 1488, 189-210

401) **Chapman MJ, Laplaud PM, Luc G, Forgez P, Bruckertt E, Goulinet S, Lagrange D,** Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma : physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation, J Lipid Res, 1988, 29, 442-458

402) **Musliner TA, Krauss RM**, Lipoprotein Subspecies and Risk of Coronary Disease, Clinical Chamistry, 1988, 34 (8B), B78-B83

403) **Shen MMS, Krauss RM, Lindgren FT, Forte TM**, Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal subjects , J Lipid Res, 1981, 22, 236-244

404) **La Belle M, Blanche PJ, Krauss RM,** Charge properties of low density lipoprotein subclasses, J Lipid Res, 1997, 38, 690-700

405) **Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM,** Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size, Atherosclerosis, 1992, 93, 189-199

406) **Chapman MJ, Cadman H, Laplaud PM**, Heterogeneity in apo B,E receptor binding of human LDL subspecies, Circulation, 1984, Circulation, 70, II-137, abs. No. 547.

407) **Adler L, Hill JS, Frohlich J,** Chemical Precipitation of Apolipoprotein B-Containing Lipoprotein Facilities Determination of LDL Particle Size, Clinical Biochemistry, 2000, 33, 187-190

408) **Krauss RM, Burke DJ,** Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans, J Lipid Res, 1982, 23, 97-104

409) **McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ,** Effect of Gender, Age, and Lipid Status on Low Density Lipoprotein Susfraction Distribution, Atherosclerosis, 1987, 7, 483-490

410) **Campos H, Blijlevens E, McNamara JR,** LDL Particle Size Distribution, Results From the Framingham Offspring Study, Atherosclerosis and Thrombosis, 1992, 12, 1410-1419

411) **Krauss RM,** Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk, 1994, 5, 339-349

412) **Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD**, Identifying the predominant peak diameter of high-density lipoproteins by electrophoresis, J Lipid Res,1990, 31, 1131-1139

413) **Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM.** Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial Infarction, JAMA 1988, 260, 1917-21

414) **Rainwater DL,** Lipoprotein correlates of LDL particle size, Atherosclerosis, 2000, 148, 151-158

415) **Sniderman AD, Scantlebury T, Cianflone K,** Hypertriglyceridemic HyperapoB : The Unappreciated Atherogenic Dyslipoproteinemia in Type 2 Diabetes Mellitus, Ann Intern Med, 2001, 135, 447-459

416) **Lamarche B, Lemieux I, Despres JP,** The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease : epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects, Diabetes and Metabolism, 1999, 25, 199-211

417) **Krauss RM,** Atherogenicity of Triglyceride-Rich Lipoproteins, Am J Cardiol, 1998, 81, 13B-17B

418) **St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard P-M, Despres J-P, Lamarche B,** Comparison of Various Electrophoretic Characteristics of LDL Particles and Their Relationship to the Risk of Ischemic Heart Disease, Circulation, 2001, 104, 2295-2299

419) **Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP**, Small, Dense Low-Density Lipoprotein Particles as a Predictor of the Risk of Ischemic Heart Disease in Men, Circulation, 1997, 95, 69-75

420) **Krauss RM,** Dense Low Density Lipoproteins and Coronary Artery Disease, Am J Cardiol, 1995, 75, 53B-57B

421) **Campos H, Genest JJ Jr, Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PWF, Schaefer EJ,** Low Density Lipoprotein Particle Size and Cononary Artery Disease, Atherosclerosis and Thrombosis, 1992, 12, 187-195

422) **Lamarche B, Tchernof A, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP**, Fasting Insulin and Apolipoprotein B Levels and Low-Density Lipoprotein Particle Size as Risk Factors for Ischemmic Heart Disease, JAMA, 1998, 279, 1955-1961

423) **Austin MA, Rodriguez BL, McKnight B, McNelly MJ, Edwards KL, Curb D, Sharp DS,** Low-Density Lipoprotein Particle Size, Triglycerides, and High-Density Lipoprotein Cholesterols as Risk Factors for Coronary Heart Disease in Older Japanese-American Men, Am J Cardiol, 2000, 86, 412-416

424) **Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer J-C, Aubin F, Rattier S, Foucher C, Hamsten A, Taskinen M-R, on behalf of the DAIS Group,** Relationships Between Low-Density Lipoprotein Particle Size, Plasma Lipoproteins, and Progression of Coronary Artery Disease, Circulation, 2003, 107, 1733-1737

425) **Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, Hennekens CH,** A Prospective Study of Triglyceride Level, Low-Density Lipoprotein Particle Diameter, and Risk of Myocardial Infarction, JAMA, 1996, 276, 882-888

426) **Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM,** Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women, JAMA, 1996, 276, 875-881

427) **Blake GJ, Otvos JD, Rifai N, Ridker PM,** Low-Density Lipoprotein Particle Concentration and Size as Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as Predictors of Cardiovascular Disease in Women, Circulation, 2002, 106, 1930-1937

428) **Gray RS, Robbins DC, Wang W, Yeh JL, Fabsitz RR, Cowan LD, Welty TK, Lee ET, Krauss RM, Howard BV,** Relation of LDL Size to the Insulin Resistance

Syndrome and Coronary Heart Disease in American Indians : The Strong Heart Study, Arterioscl Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 2713-2720

429) **Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM,** Enhanced Oxidative Susceptibility and Reduced Antioxidant Content of Metabolic Precursors of Small, Dense Low-Density Lipoproteins, Am J Med, 2001, 110, 103-110

430) **Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM,** Susceptibility of Small, Dense, Low-Density Lipoproteins to Oxidative Modification in Subjects With the Atherogenic Lipoprotein Phenotype, Pattern B, Am J Med, 1993, 94, 350-356

431) **Tribble DL, Krauss RM, Landsberg MG, Thiel PM, Berg JM,** Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small, dense LDL may contribute to differences in copper-induced oxidation among LDL subfractions, J Lipid Res, 1995, 36, 662-671

432) **Tribble DL, Chu BM, Levine GA, Krauss RM, Gong EL,** Selective Resistance of LDL Core Lipids to Iron-Mediated Oxidation; Implications for the Biological Properties of Iron-Oxidized LDL, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996, 16, 1580-1587

433) **Campos H., Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM,** Differences in Receptor Binding of LDL Subfractions, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996, 16, 794-801

434) **Anber V, Millar JS, McConnell M, Shepherd J, Packard CJ,** Interaction of very-low-density, intermediate-density, and low-density lipoproteins with human arterial wall proteoglycans, Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997, 17, 2507-14

435) **Nordestgaard BG, Nielsen LB**, Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins, Current Opinion in Lipidology, 1994, 5, 252-257

436) **Lupattelli G, Lombardini R, Schillaci G, Ciuffetti G, Marchesi S, Siepi D, Mannarino E,** Flow-mediated vasoactivity and circulating adhesion molecules in hypertriglyceridemia : Assocation with small, dense LDL cholesterol particles, Am Heart J, 2000, 140, 521-526

437) **Reaven GM, Chen Y-D I, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM,** Insulin Resistance and Hyperinsulinemia in Individuals with Small, Sense, Low Density Lipoprotein Particles, J Clin Invest, 1993, 92, 141-146

438) **Gray RS, Robbins DC, Wang W, Yeh JL, Fabsitz RR, Cowan LD, Welty TK, Lee ET, Krauss RM, Howard BV**, Relation of LDL Size to the Insulin Resistance Syndrome and Coronary Heart Disease in American Indiens, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 2713-2720

439) **Ambrosch A, Muhlen I, Kopf D, Augustin W, Dierkes J, Konig W, Luley C, Lehnert H,** LDL Size Distribution in relation to Insulin Sensitivity and Lipoprotein Pattern in Young and Healthy Subjects, Diabetes Care, 1998, 12, 2077-2084

440) **Festa A, D'Agostino R, Mykkanen L, Tracy RP, Hales CN, Howard BV, Haffner AM,**LDL Particle Size in Relation to Insulin, Proinsulin, and Insulin Sensitivity, Diabetes Care, 1999, 1688-1693

441) **Rainwater DL, Mitchell BD, Comuzzie AG, Haffner SM**, Relationship of low-density lipoprotein particle size and measures of adiposity », International Journal of Obesity, 1999, 23, 180-189

442) **Blackburn P, Cote M, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Despres JP,** Impact of postprandial variation in triglyceridemia on low-density lipoprotein particle size, Metabolism, 2003, 52(11),1379-86

443) **Friedlander Y, Kidron M, Caslake M, Lamb T, McConnell M, Bar-On H,** Low density lipoprotein particle size and risk factors of insulin resistance syndrome, Atherosclerosis, 2000, 148, 141-149

444) **Hulthe J, Bokemark L, Wikstrand J, Fagerberg B,** The Metabolic Syndrome, LDL Particle Size, and Atherosclerosis; The Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) Study, Arterioscl Thromb Vasc Biol, 2000, 20, 2140-2147

445) **Austin MA, Edwards KL**, Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and non-dependent diabetes, Current Opinion in Lipidology, 1996, 7, 167-171

446) **Austin MA, Newman B, Selby JV,** Genetics of LDL Subclass Phenotypes in Women Twins; Concordance, Heritability; and Commiting Analysis, Atherosclerosis and Thrombosis, 1993, 13, 687-695

447) **Austin MA, Krauss RM,** Genetic Control of Low-Density-Lipoprotein Subclasses, The Lancet, 1986, 592-595

448) **Austin MA, King M-C, Vranizan KM, Newman B, Krauss,** Inheritance of Low-Density Lipoprotein Subclass Patterns : Results of Complex Segregation Analysis, Am J Hum Genet, 1988, 43, 838-846

449) **Naggert JK, Recinos III A, Lamerdin JE, Krauss RM, Nishina PM,** The atherogenic lipoprotein phenotype is not caused by a mutation in the coding region of the low density lipoprotein receptor gene, Clin Genet, 1997, 51, 236-240

450) **Rotter JI, Bu X, Cantor R, Warden CH, Brown J, Gray RJ, Blanche PJ, Krauss RM, Lusis AJ,** Multilocus Genetic Determinants of LDL Particle Size in Coronary Artery Disease Families, Am J Hum Genet, 1996, 58, 585-594

451) **Talmud PJ, Edwards KL, Turner CM, Newman B, Palmen JM, Humphries SE, Austin MA,** Linkage of the Cholesteryl Ester Transfer Protein *(CETP)* Gene to LDL Particle Size, Circulation, 2000, 101, 2461-2466

452) **Austin MA, Talmud PJ, Luong L-A, Haddad L, Day INM, Newman B, Edwards KL, Krauss RM, Humphries,** Candidate-Gene Studies of the Atherogenic Lipoprotein Phenotype : A Sib-Pair Linkage Analysis of DZ Women Twins, An J Hum Genet, 1998, 62, 406-419

453) **Havel RJ,** Genetic underprintings of LDL size and density : a role for hepatic lipase?, An J Clin Nutr, 2000, 71, 1390-1391

454) **Ruel IL, Gaudet D, Perron P, Bergeron J, Julien P, Lamarche B**, Effect of obesity on HDL and LDL particle sizes in carriers of the null P207L or defective D9N mutation in the lipoprotein lipase gene, International Journal of Obesity, 2003, 27, 631-637

455) **Gertow K, Skoglund-Anderson C, Eriksson P, Boquist S, Orth-Gomer K, Schenck-Gustafsson, Hamsten A, Fisher RM,** A common polymorphism in the fatty acid transport protein-1 gene associated with elevated post-prandial lipaemia and alterations in LDL particle size distribution, Atherosclerosis, 2003, 167, 265-273

456) **Skoglund-Anderson C, Ehrenborg E, Fisher RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F,** Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men, Atherosclerosis, 2003, 167, 311-317

457) **Bosse Y, Perusse L, Despres J-P, Lamarche B, Chagnon YC, Rice T, Rao DC, Bouchard C, Vohl M-C,** Evidence for a Major Quantitative Trait Locus on Chromosome 17q21 Affecting Low-Density Lipoprotein Peak Particle Diameter, Circulation, 2003, 107, 2361-2368

458) **Campos H, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, O'Hanesian MA, Krauss RM,** Differential effects of estrogen on low-density lipoprotein subclasses in healthy postmenopausal women, Metabolism, 1993, 42, 1153-8

459) **Dreon DM, Fernstrom HA, Williams PT, Krauss RM,** A very-low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins, Am J Clin Nutr, 1999, 69, 411-418

460) **Dreon DM, Fernstrom HA, Campos H, Blanche P, Williams PT, Krauss RM,** Change in dietary saturated fat intake is correlated with change in mass of large low-density-lipoprotein particles in men, Am J Clin Nutr, 1998, 67, 828-836

461) **Nenseter MS, Rustan AC, Lund-Katz S, Soyland E, Maelandsmo G, Phillips MC, Drevon CA,** Effect of Dietary Supplementation With n-3 Polyinsaturated Fatty Acids on Physical Properties and Metabolism of Low Density Lipoprotein in Humans, Arterioscler Thromb, 1992, 12, 369-379

462) **Contacos C, Barter PJ, Sullivan DR,** Effect of Pravastatin and Omega-3 Fatty Acids on Plasma Lipids and Lipoproteins in Patients With Combined Hyperlipidemia, Arterioscler Thromb, 1993, 13, 1755-1762

463) **Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Best JD, Beilin LJ,** Docosahexaenoic Acid But Not Eicosapentaenoic Acid Increases LDL Particle Size in Treated Hypertensive Type 2 Diabetic Patients, Diabetes Care, 2003, 26(1), 253

464) **Packard CJ, Shepherd J**, Lipoprotein Heterogeneity and Apolipoprotein B Metabolism, ATVB, 1997, 17, 3542-3556

465) **Berneis KK, Krauss RM**, Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity, J Lipid Res, 2002, 43, 1363-1379

466) **Zambon A, Brown G, Deeb SS, Brunzell JD**, Hepatic Lipase as a Focal Point for the Development Treatment of Coronary Artery Disease, J. Investig Med, 2001, 49, 112-118

467) **Perret B, Mabile L, Martinez L, Terce F, Barbaras R, Collet X**, Hepatic lipase : structure/function relationship, synthesis and regulation, J Lipid Res, 2002, 43, 1163-1169

468) **Packard C, Caslake M, Shepherd J,** The role of small, dense low-density lipoprotein (LDL) : a new look, Int J Cardiol, 2000, 74 (suppl1), S17-S22

469) **Swinkels DW, Hak-Lemmers HLM, Demacker PMN**, Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low density lipoprotein subfractions », J Lipid Res, 1987, 28; 1233-1239

470) **Van Antwerpen R., La Belle M., Navratilova E., Krauss R.M.,** *« Structural heterogeneity of apo B-containing serum lipoproteins visualized using cryo-electron microscopy »;* J Lipid Res; 1999; 40; 1827-1836.

471) **Scheffer PG, Bakker SJL, Heine RJ, Teerlink T**, Measurement of low-density lipoprotein particle size by high-performance gel-filtration chromatography Clin Chem, 1997, 43, 1904

472) **Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien J, Branum EL, Sun D, Meissner I, McConnell JP**, Development of a Rapid, Quantitative Method for LDL Subfractionation with Use of the Quantimetrics Lipoprint LDL System, Clin Chem, 2001, 47 :2, 266-274

473) **O'Neal D, Harrip P, Dragicevic G, Rae D, Best JD**, A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods, J Lipid Res, 1998, 39, 2086-2090

474) **Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC**, Measurement Issues Related to Lipoprotein Heterogeneity, Am J Cardiology, 2002, 90 (suppl), 22i-29i

475) **Wagner AM, Jorba O, Rigla M, Alonso E, Ordonez-Llanos J, Perez A,** LDL-cholesterol/apolipoprotein B ratio is a good predictor of LDL phenotype B in type II diabetes, Acta Diabetol, 2002, 39, 215-220

476) **Tchernof A, Lamarche B, Prud'home D, Naddeau A, Moorjani S, Labrie F, Lupien PJ, Depres JP,** The dense LDL phenotype. Association with plasma

lipoprotein levels, visceral obesity and hyperinsulinemia in men, Diabetes Care, 1996, 19, 629-637

477) **Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Sheferd J,** Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions : relative contribution of small dense LDL to coronary heart disease risk, Atherosclerosis, 1994, 106, 241-253

478) **Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Almeras N, Bergeron J, Gaudet D, Tremblay G, Prud'homme D, Nadeau A, Despres J-P,** Hypertriglyceridemic Waist, A Marker of the Atherogenic Metabolic Triad (Hyperinsulinemia; Hyperapolipoprotein B; Small, Dense LDL) in Men? Circulation, 2000, 102, 179-184

479) **Sniderman AD, Dagenais GR, Cantin B, Despres J-P, Lamarche B,** High Apolipoprotein B With Low High-Density Lipoprotein Cholesterol and Normal Plasma Triglycerides and Cholesterol, Am J Cardiology, 2001, 87, 792-793

480) **Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S,** Ratio of Triglycerides to HDL Cholesterol Is an Indicator of LDL Particle Size in Patients With Type 2 Diabetes and Normal HDL Cholesterol Levels, Dabetes Care, 2000, 23 (11), 1679-1685

481) **Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM,** Atherogenic lipoprotein profile, Circulation, 1990, 82, 495-506

482) **Dobiasova M, Frohlich J,** The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index : correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apo B-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)), Clin Biochem, 2001, 34(7), 583-588

483) **Criqui MH, Golomb BA,** Epidemiologic aspects of lipid abnormalities, Am J Med, 1998, 105 (1A), 48S-57S

484) **Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Malcolm I, Skinner B, Kwiterovich PO,** The association of coronary atherosclerosis and hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol content in human plasma low density lipoprotein), Proc Naltl Acad Sci USA, 1980, 97, 604-608

485) **Waldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E.** « High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study, Lancet, 2001, 358, 2026-2033

486) **Sniderman AD, Cianflone K,** Measurement of apoproteins : time to improve the diagnosis and treatment in the atherogenic dyslipoproteinemias, Clin Chem, 1996, 42, 489-491

487) **Furuya D, Yagihashi A, Nasu S,** LDL Particle Size by Gradient-Gel Electrophoresis Canot Be Estimated by LDL-Cholesterol/Apolipoprotein B Ratios, Clinical Chemistry, 2000, 46, 1202-1203

488) **Tallis GA, Shephard MD, Sobecki S, Whiting MJ,** The total apolipoportein B/LDL-cholesterol ratio does not predict LDL particle size, Clin Chim Acta, 1995, 240(1), 63-73

489) **Freedman DS, Bowman BA, Otvos JD, Srinivasan SR, Berenson GS,** Levels and correlates of LDL and VLDL particle sizes among children : The Bogalusa heart study, Atherosclerosis, 2000, 152, 441-449

490) **Arisaka O, Fujiwara S, Yabuta K, Mokuno H, Mituji Y, Miyake N,** Characterization of Low-Density Lipoprotein Subclasses in Children, Metabolism, 1997, 46(2), 146-148

491) **Arisaka O, Kojima M, Yamazaki Y, Kanazawa S, Koyama S, Shimura N, Okada T,** Relationship between the Presence of Small, Dense Low-density Lipoprotein and Plasma Lipid Phenotypes in Japanese Children, J Atheroscler Thromb, 2004, 11, 220-3

492) **Ohta T, Nishiyama S, Nakamura T, Saku K, Maung KK, Matsuda I,** Predominance of large low density lipoprotein particles and lower fractional esterification rate of cholesterol in high density lipoprotein in children with insulin-dependent diabetes mellitus, Eur J Pediatr, 1998, 157, 276-281

493) **Ohta T, Kakiuti Y, Kurahara K, Saku K, Nagata N, Matsuda I**, Fractional esterification rate of cholesterol in high density lipoprotein is correlated with low density lipoprotein particle size in children, J Lipid Res, 1997, 38, 139-46

494) **Shimabukuro T, Sunagawa M, Ohta T,** Low-density lipoprotein particle size and its regulatory factors in school children, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89, 2923-7

495) **Kang H-S, Gutin B, Barbeau P, Litaker MS, Allison J, Le N-A,** Low-density lipoprotein particle size, central obesity, cardiovascular fitness, and insulin resistance syndrome markers in obese youths, International Journal of Obesity, 2002, 26, 1030-1035

496) **Steinbeck KS, Bermingham MA, Mahajan D, Baur LA**, Low-density lipoprotein subclasses in children under 10 years of age. J Paediatr Child Health 2001, 37, 550-3

497) **Siirtola A, Antikainen M, Ala-Houhala M, Solakivi T, Jokela H, Lehtimaki T, Holmberg C, Salo MK**, Studies of LDL particle size and susceptibility to oxidation and association with glucose metabolism in children after heart transplantation, J Heart Lung Transplant, 2004, 23, 418-26

498) **Kaitosaari T, Ronnemaa T, Raitakari O, Talvia S, Kallio K, Volanen I, Leino A, Jokinen E, Valimaki I, Viikari J, Simell O,** Effect of 7-year infancy-onset dietary intervention on serum lipoproteins and lipoprotein subclasses in healthy children in the prospective, randomized Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project for Children (STRIP) study, Circulation, 2003,108, 672-7

499) **Shea S, Aymong E, Zybert P, Berglund L, Shamoon H, Deckelbaum RJ, Basch CE**, Fasting plasma insulin modulates lipid levels and particle sizes in 2- to 3-year-old children, Obes Res, 2003, 11, 709-21

500) **Tso TK, Snook JT, Lozano RA, Zipf WB,** Risk factors for coronary heart disease in type 1 diabetic children: the influence of apoE phenotype and glycemic regulation, Diabetes Res Clin Pract 2001, 54,165-71

501) **Williams PT, Krauss RM,** Associations of age, adiposity, menopause, and alcohol intake with low-density lipoprotein subclasses, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 1082-90

502) **Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers Jr MG**, Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor, J Biol Chem, 2000, 275 (19), 14563-14572

503) **Mantzoros CS,** The Role of Leptin in Human Obesity and Disease : A Review of Current Evidence, Ann Intern Med, 1999, 130, 671-680

504) **Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C**, Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition, FASEB J, 2001,15, 2565-2571

505) **Ohkubo T, Tanaka M, Nakashima K**, Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor (cOb-R) mRNA, Biochim et Biophys Acta, 2000, 1491, 303-308

506) **Lin J, Barb CR, Matteri RL, Kraeling RR, Chen X, Meinersmann RJ, Rampacek GB**, Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig, Dom Animal Endocr, 2000, 19, 53-61

507) **Clayton PE, Trueman JA**, Leptin and puberty, Arch Dis Child, 2000, 83, 1-9

508) **Kiess W, Blum WF, Aubert ML**, Leptin, puberty and reproductive function : lessons from animal studies and observations in humans, Eur J Endocr, 1998, 138, 26-29

509) **Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A**, Leptin in reproduction, Trends in Endocr & Metabolism, 2001, 12 (2), 65-71

510) **Fruhbeck G**, A heliocentric view of leptin , Proceedings of the Nutrition Society, 2001, 60, 301-318

511) **Auwerx J, Staels B**, Leptin, Lancet, 1998, 351, 737-42

512) **Baile CA, Della-Fera MA, Martin RJ**, Regulation of Metabolism and Body Fat Mass by Leptin, Annu. Rev Nutr, 2000, 105-27

513) **Lahlou N, Clement K, Carel JC, Vaisse C, Lotton C, Le Bihan Y, Basdevant A, Lebouc Y, Froguel P, Roger M, Guy-Grand B,** Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass, Diabetes, 2000 49(8), 1347-52

514) **Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C,** Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced-Obese Mice, Endocrinology, 2004 Jul 22 [Epub ahead of print]

515) **Van Gaal LF, Wauters MA, Mertens IL, Considine RV, De Leeuw IH**, Clinical endocrinology of human leptin, International Journal of Obesity, 1999, 23 Suppl 1, 29-36

516) **Leonhardt M, Hrupka B, Langhans W,** New appoaches in the pharmacological treatment of obesity, European Journal of Nutrition, 1999, 38, 1-13

517) **Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA**, Leptin action in intestinal cells, J Biol Chem, 1998, 273(40), 26194-201

518) **Lostao MP, Urdaneta E, Martinez-Anso E, Barber A, Martinez JA,** Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption, FEBS Lett, 1998, 423(3), 302-6

519) **Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ,** The stomach is a source of leptin, Nature, 1998, 394, 790-793

520) **Mix H, Widjaja A, Jandl O, Cornberg M, Kaul A, Goke M, Beil W, Kuske M, Brabant G, Manns MP, Wagner S,** Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach, Gut, 2000, 47(4), 481-6

521) **Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ,** Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach, Gut, 2000, 47, 178-183

522) **Lewin M.J.M., Bado A**, Gastric Leptin, Microsc Res Tech, 2001, 53, 372-376

523) **Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP., Bado A**, Duodenal Leptin Stimulates Cholecystokinin Secretion – Evidence of a Positive Leptin-Cholecystokinin Feedback Loop, Diabetes, 2003, 52, 1664-1672

524) **Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Brzozowska I, Duda A, Meixner H, Hahn EG, Konturek SJ,** Role of leptin in ulcer healing, Eur J Pharmacol, 2001, 414(1), 87-97

525) **Smith PM, Mollaret V, Ferguson AV,** Leptin acts in the rat hypothalamic paraventricular nucleus to induce gastric mucosal damage, Am J Physiol, 1998, 275 (6 Pt 2), 2081-4

526) **Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Munoz-Navas M, Barber A, Lostao MP,** Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes, Gut, 2002, 50(6), 797-802

527) **Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA,** Leptin action in intestinal cells, J Biol Chem, 1998, 2, 273(40), 26194-201

528) **Alavi K, Schwartz MZ, Prasad R, O'Connor D, Funanage V**, Leptin: A New Growth Factor for the Small Intestine, J Pediatr Surg, 2002, 37, 327-330

529) **Pearson PY, O'Connor DM, Schwartz MZ,** Novel effect of leptin on small intestine adaptation, J Surg Res, 2001, 97(2), 192-5

530) **Aparicio T, Guilmeau S, Goiot H, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A, Sobhani I, Lehy T,** Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa, Gastroenterology, 2004, 126(2), 499-510

531) **Utsumi H, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Sakata H, Shimoda R, Amemori S, Tsunada S, Ootani A, Fujimoto K,** Intracerebroventricular administration of leptin-induced apoptosis in the rat small intestinal mucosa, Exp Biol Med (Maywood), 2003, 228(10), 1239-44

532) **Ballinger A**, Divergency of leptin response in intestinal inflammation, Gut, 1999, 44, 588-589

533) **Barbier M, Vidal H, Desreumaux P, Dubuquoy L, Bourreille A, Colombel JF, Cherbut C, Galmiche JP,** Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases, Gastroenterol Clin Biol, 2003, 27(11), 987-91

534) **Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Peranzi G, Merlin D, Laburthe M, Lewin MJ, Roze C, Bado A,** PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalexin is enhanced by luminal leptin in the small intestine, J Clin Invest, 2001, 108(10), 1483-94

535) **Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A, Merlin D,** Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE, J Biol Chem, 2002, 277(31), 28182-90

536) **Aubin J, C Lavallee, J Camirand, N Audet, Beauvais B, Berthiaume P**, Enquête sociale et de santé auprès des enfants et adolescents québécois 1999, Québec, Institut de la statistique du Québec, 520 p.

537) **Lavallee C**, Enquête sociale et de santé auprès des enfants et adolescents québécois, Volet nutrition, Québec, Institut de la statistique du Québec, 166 p., 2004

538) **Paradis G, Lambert M, O'Loughlin J, Lavallee C, Aubin J, Berthiaume P, Ledoux M, Delvin EE, Levy E, Hanley JA,** The Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey: design and methods of a cardiovascular risk factor survey for youth, Can J Cardiol, 2003, 19(5), 523-31

539) **Paradis G, Lambert M, O'Loughlin J, Lavallee C, Aubin J, Delvin E, Levy E, Hanley JA,** Blood pressure and adiposity in children and adolescents, Circulation, 2004, 110(13), 1832-8

540) **Lambert M, Paradis G, O'Loughlin J, Delvin EE, Hanley JA, Levy E,** Insulin resistance syndrome in a representative sample of children and adolescents from Quebec, Canada, Int J Obes Relat Metab Disord, 2004, 7, 833-41

541) **Hanhoff T, Lucke C, Spener F**, Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins, Mol Cell Biochem, 2002, 239, 45-54

542) **Hsu K-T, Storch J**, Fatty Acid Transfer from Liver and Intestinal Fatty Acid-binding Proteins to Membranes occurs by Different Mechanisms, J Biol Chem, 1996, 271(23), 13317-13323

543) **Besnard P, Niot I, Poirier H, Clement L, Bernard A**, New insights in the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine, Mol Cell Biochem 2002, 239, 139-147

544) **Schroeder F, Jolly CA, Cho T-H, Frolov A**, Fatty acid binding protein isoforms: structure and function, Chem Phys Lipids, 1998, 92, 1-25

545) **Zhang F, Lucke C, Baier LJ, Sacchettini JC, Hamilton JA**, Solution structure of human intestinal fatty acid binding protein: Implications for ligand entry and exit, J Biomol NMR, 1997, 9, 213-228

546) **Zhang F, Lucke C, Baier LJ, Sacchettini JC, Hamilton JA**, Solution Structure of Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein with a Naturally-Occurring Single Amino Acid Substitution (A54T) that Is Associated with Altered Lipid Metabollism, Biochemistry, 2003, 42, 7339-7347

547) **Pratley RE, Baier L, Pan DA, Salbe AD, Storlien L, Ravussin E, Bogardus C,** Effects of an Ala54Thr polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein on responses to dietary fat in humans, J Lipid Res, 2000, 41(12), 2002-2008

548) **Jemaa R, Tuzet S, Portos C, Betoulle D, Apfelbaum M, Fumeron F**, Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people, Int J Obes Relat Metab Disord, 1995, 19(4), 270-4

549) **Bernard S, Moulin P, Lagrost L, Picard S, Elchebly M, Ponsin G, Chapuis F, Berthezene F,** Association between plasma HDL-cholesterol concentration and Taq1B CETP gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus, J Lipid Res, 1998, 39(1), 59-65

550) **Acton S, Osgood D, Donoghue M, Corella D, Pocovi M, Cenarro A, Mozas P, Keilty J, Squazzo S, Woolf EA, Ordovas JM**, Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(7), 1734-43

551) **Osgood D, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Wilson PW, Meigs JB, Schaefer EJ, Coltell O, Ordovas JM,** Genetic variation at the scavenger receptor class B type I gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: the framingham study, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(6), 2869-79

552) **Thibault L, Menard D, Loirdighi N, Levy E**, Ontogeny of intestinal lipid and lipoprotein synthesis, Biol Neonate, 1992, 62, 2-3, 100-107

553) Levy E, Totov W, Seidman EG, Garofalo C, Delvin E, Menard D, Caco-2 cells and human fetal colon: a comparative analysis of their lipid transport, Biochim Biophys Acta, 1999, 1439(3), 353-362

554) Levy E, Menard D, Developmental aspects of lipid and lipoprotein synthesis and secretion in human gut, Microsc Res Tech, 2000, 49(4), 363-373

555) Levy E, Thibault L, Delvin E, Manard D, Apolipoportein synthesis in human fetal intestine: regulation by epidermal growth factor, Biochem Biophys Res Comm, 1994, 204(3), 1340-1345

556) **Chan L, Chang BH, Liao W, Oka K, Lau PP,** Apolipoprotein B: from editosome to proteasome, Recent Prog Horm Res, 2000, 55, 93-125

557) Shelness GS, Ingram MF, Huang XF, DeLozier JA, Apolipoprotein B in the rough endoplasmic reticulum: translation, translocation and the initiation of lipoprotein assembly, J Nutr, 1999, 129(2S Suppl), 456S-462S

558) **Couture P, Brun LD, Szots F, Lelievre M, Gaudet D, Despres J-P, Simard J, Lupien PJ, Gagne C**, Association of Specific LDL Receptor Gene Mutations With Differential Plasma Lipoprotein Response to Simvastatin in Young French Canadians With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18, 1007-1012

559) **Scriver CR**, Human genetics: lessons from Quebec populations, Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001, 2, 69-101

560) **Erkkila AT, Lindi V, Lehto S, Pyorala K, Laasko M, Uusitupa MI**, Variation in the fatty acid binding protein 2 gene is not associated with matkers of metabolic syndrome in patients with coronary heart disease, Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2002, 12(2), 53-59

561) **Berthier MT, Couillard C, Prod'homme D, Nadeau A, Bergeron J, Tremblay A, Despres JP, Vohl MC**, Effects of the FABP2 A54T mutation on trglyceride metabolism of viscerally obese men, Obes Res, 2001, 9(11), 668-675

562) **Ishii T, Hirose H, Kawai T, Hayashi K, Maruyama H, Saito I, Saruta T,** Effects of intestinal fatty acid-binding protein gene Ala54Thr polymorphism and beta3-adrenergic receptor gene Trp64Arg polymorphism on insulin resistance and fasting plasma glucose in young to older Japanese men, Metabolism, 2001, 50(11), 1301-7

563) **Cartwright IJ, Higgins JA,** Quantification of apolipoprotein B-48 and B-100 in rat liver endoplasmic reticulum and Golgi fractions, Biochem J, 1992 285 (Pt 1), 153-9

564) **Wilkinson J, Higgins JA, Groot PH, Gherardi E, Bowyer DE,** Determination of the intracellular distribution and pool sizes of apolipoprotein B in rabbit liver, Biochem J, 1992, 288 (Pt 2), 413-9

565) **Swift LL,** Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B, J Biol Chem, 1996, 271(49), 31491-5

566) **Tran K, Thorne-Tjomsland G, DeLong CJ, Cui Z, Shan J, Burton L, Jamieson JC, Yao Z,** Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells, J Biol Chem, 2002, 277(34), 31187-200

567) **Cartwright IJ, Higgins JA,** Intracellular events in the assembly of very-low-density-lipoprotein lipids with apolipoprotein B in isolated rabbit hepatocytes, Biochem J, 1995, 310 (Pt 3), 897-907

568) **Higgins JA,** Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex, FEBS Lett, 1988, 232(2), 405-8

569) **Valyi-Nagy K, Harris C, Swift LL**, The asssembly of hepatic very low-density lipoporteins: evidence of a role for the Golgi apparatus, Lipids, 2002, 37(9), 879-884

570) **Swift LL, Zhu MY, Kakkad B, Jovanovska A, Neely MD, Valyi-Nagy K, Roberts RL, Ong DE, Jerome WG**, Subcellular localization of microsomal triglyceride transfer protein, J Lipid Res, 2003, 44(10),1841-9

571) **Hebbachi AM, Brown AM, Gibbons GF**, Suppression of cytosolic triacylglycerol recruitment for very low density lipoprotein assembly by inactivation of microsomal triglyceride transfer protein results in a delayed removal of apoB-48 and apoB-100 from microsomal and Golgi membranes of primary rat hepatocytes, J Lipid Res, 1999, 40(10),1758-68

572) **Witte DR, Taskinen MR, Perttunen-Nio H, Van Tol A, Livingstone S, Colhoun HM,** Study of agreement between LDL size as measured by nuclear magnetic resonance and gradient gel electrophoresis, J Lipid Res, 2004, 45(6), 1069-76

573) **Lamarche B, St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Desprès J-P**, A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men, Can J Cardiol, 2001, 17, 8, 859-865

574) **Grundy SM**, Small LDL, Atherogenic Dyslipidemia and the Metabolic Syndrome, Circulation, 1997, 95, 1-4

575) **Muruyama C, Imamura K, Teramoto T**, Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia, J Atheroscler Thromb, 2003, 10, 186-91

576) **Hanak V, Munoz J, Teague J, Stanley A Jr, Bittner V**. Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ration for prediction of the low-density lipoprotein phenotype B, Am J Cardiol, 2004, 94, 219-22

577) **Ho RC, Davy K, Davy B, Melby CL,** Whole-body insulin sensitivity, low-density lipoprotein (LDL) particle size, and oxidized LDL in overweight, nondiabetic men, Metabolism, 2002, 51(11), 1478-83

578) **Slyper AH, Zvereva S, Schectman G, Hoffman RG, Mueller RA, Walker JA**, Insulin resistance is not a major determinant of low-density lipoprotein particle size, Metabolism, 1997, 46, 11, 1275-1280

579) **Lahdenpera S, Sane T, Vuorinen-Markkola H, Knudsen P, Taskinen MR,** LDL particle size in mildly hypertriglyceridemic subjects: no relation to insulin resistance or diabetes, Atherosclerosis, 1995, 113(2), 227-36

580) **Howard BV, Mayer-Davis EJ, Goff D, Zaccaro Dj, Laws A, Robbins DC, Saad MF., Selby J, Hamman RF, Krauss RM, Haffner SM**, Relationships between insulin resistance and lipoporteins in nondiabetic African Americans, Hispanics, and Non-Hispanic Whites: the insulin resistance atherosclerosis, Metabolism, 1998, 47, 10, 1174-1179

581) **Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G,** Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals, Diabetes, 1993, 42(6), 833-42

582) **Bioletto S, Golay A, Munger R, Kalix B, James RW,** Acute hyperinsulinemia and very-low-density and low-density lipoprotein subfractions in obese subjects, Am J Clin Nutr, 2000, 71(2), 443-9

583) **RA Borchardt and RA Davis,** Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion, J Biol Chem, 1987, 262, 16394-16402

584) **Stan S, Delvin E, Lambert M, Seidman E, Levy E**, Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions, Biochim Biophys Acta, 2003, 1631(2),177-87

585) **Doi T, Liu M, Seeley RJ, Woods SC, Tso P**, Effect of leptin on intestinal apolipoprotein A-IV in response to lipid feeding, Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, 2001, 281, R753-R759

586) **Hales CN, Ozanne SE,** For Debate: Fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure, Diabetologia, 2003, 46(7), 1013-9

587) **Snyder EE, Walts B, Pérusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Ranki T, Bouchard C**, The Human Obesity Gene Map: The 2003 Update, Obes Res, 2004, 12(3), 369-439.

588) **Young TK, Martens PJ, Shayne PT, Sellers EAC, Dean HJ, Mmath MC, Flett B**, Type 2 Diabetes in Children; Prenatal and Early Infancy Risk Factors Among Native Canadians, Arch Pediatr Adolesc Med, 2002, 156, 651-55

589) **Gungor N, Saad R, Janosky J, Arslanian S**, Validation of surrogate estimates of insulin sensitivity and insulin secretion in children and adolescents, J Pediatr. 2004 Jan;144(1):47-55

590) **Conwell LS, Trost SG, Brown WJ, Batch JA**, Indexes of Insulin Resistance and Secretion in Obese Children and Adolescents, Diabetes Care, 2004, 27, 314-19

591) **Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J, Elberg J, Parikh SJ, Yanovski JA**, Indices of Insulin Action, Disposal, and Secretion Derived From Fasting Samples and Clamps in Normal Glucose-Tolerant Black and White Children, Diabetes Care, 2002, 25, 2081-87

592) **Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH,** Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity, QJM, 2000, 93, 85-91

593) **Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA**, Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome, Clin Nutr, 2004, 23, 447-56

594) **Mann DR, Johnson AOK, Gimpel T, Castracane VD**, Changes in circulating leptin, leptin receptor, and gonadal hormones from infancy until advanced age in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88, 3339-45

595) **Janeckova R**, The role of leptin in human physiology and pathophysiology, Physiol Res, 2001, 50, 443-59

596) **Gil-Campos M, Canete R, Gil A**, Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity, Clin Nutr, 2004, 23, 963-74

597) **Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI**, The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89,108-13

598) **Sung RY, Tong PC, Yu CW, Lau PW, Mok GT, Yam MC, Lam PK, Chan JC**, High prevalence of insulin resistance and metabolic syndrome in overweight/obese preadolescent Hong Kong Chinese children aged 9-12 years, Diabetes Care, 2003, 26, 250-1

599) **Viner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, Hindmarsh P**, Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity, Arch Dis Child, 2005, 90, 10-4

600) **Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S**, Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents, N Engl J Med, 2004, 350, 2362-74

ANNEXE

ANNEXE

Rapport sur le contrôle de la qualité des valeurs de la taille des particules LDL

Problématique :

La qualité des données obtenues lors de la détermination de la taille des particules LDL par électrophorèse sur gel gradient dépend étroitement de la composition du gel gradient, de la migration, de la qualité de l'échantillon ainsi que de la lecture et de l'analyse densitométriques du gel. Par conséquent, un contrôle rigoureux de la qualité s'impose afin de limiter la variabilité analytique au minimum et garantir une qualité optimale des résultats obtenus.

Objectif :

Le but de cette étude relative au contrôle de la qualité a été de déterminer le coefficient de variation relié à l'électrophorèse sur gel gradient (2-16%) et de vérifier plusieurs modalités d'analyse en vue d'obtenir une valeur d'une précision maximale, et ce, avant de débuter l'analyse sur les 2249 échantillons.

Quelques méthodes de contrôle de la qualité recueillies de la littérature:

1) Tchernof A., et coll., 1996: Diabetes Care, 19 (6), p. 628-637.
   n=79

   - Duplicatas de standards pour évaluer la variation intra et inter-gels, dans les distances de migration des bandes.

   - Détermination des coefficients de variation: < 2% pour l'"inter" et < 1.5% pour l'"intra".

- Chaque échantillon de plasma a été appliqué en duplicata, sur deux gels différents et la moyenne des deux lectures a été utilisée pour les calculs.

2) Hulthe J, et coll., 1999: Scand J Clin Lab Invest, 59, p. 649-662.

n=36 (recrutement fait spécialement pour une étude de reproductibilité de la méthode)
n=818 (étude principale)

- On conclut le fait qu'on obtient des bandes plus diffuses lorsqu'on utilise du plasma (c. sérum)

- Variation "inter"-essai: Appliquer le même échantillon, deux fois, sur des gels différents, à des moments différents.
CV: 0.3%

- Variation "intra"-essai: Prélever du plasma, chez le même sujet, à des moments différents, ce qui n'est pas possible dans notre cas.

- Pour diminuer encore plus les risques d'erreurs, les bandes sont scannées deux fois et la moyenne est utilisée pour faire les calculs.

- Autres CV "inter"-essai mentionnés: 2.2% et 3.5%.

3) Hulthe J, et coll., 2000: ATVB 2000, 20, p. 2140-2147.

n=32 (recrutement fait spécialement pour une étude de reproductibilité de la méthode)
n=391 (étude principale)

- Étude de reproductibilité: 2 examens (intervalle de 2 semaines); CV: 3.39%

- Étude principale: Appliquer le même échantillon, deux fois, sur des gels différents, à des moments différents; CV: 0.3%

- Pour diminuer encore plus les risques d'erreurs, les bandes sont scannées deux fois et la moyenne est utilisée pour faire les calculs.

4) Austin MA, et coll., 2000: Am J Cardiology, (86), p. 412-416.
n=441

- On applique les échantillons sur deux gels différents et on fait la moyenne pour les calculs statistiques.

5) Lamarche B, et coll., 1997: Circulation, (95), p. 69-75. (Quebec Cardiovascular Study), n=103 paires cas-contrôles :

- On applique chaque échantillon une seule fois tout en mentionnant qu'une analyse effectuée auparavant (mais dont on ne publie pas la référence ou les données), en utilisant des mélanges de plasmas a révélé que l'identification des pics majoritaires était très reproductible (CV < 3%)

6) Kanigaki AS (équipe de Austin MA), 2001: Am J Epidemiology, (153), 945.

- On applique deux échantillons de mélanges de plasmas pour lesquels les classes de LDL sont bien définies sur chaque gel.

- On fait deux gels différents pour chaque échantillon et on utilise la moyenne des deux lectures pour les calculs.

Méthode :

A) Détermination du CV INTRA-GEL:

Prendre 5 échantillons de taille différente et les appliquer sur 5 gels différents, dix fois chacun:

1) 1 seule lecture, simplicata.

Gel 1: Échantillon 1 X 10 fois = CV-intra 1
Gel 2: Échantillon 1 X 10 fois = CV-intra 2
Gel 3: Échantillon 1 X 10 fois = CV-intra 3
Gel 4: Échantillon 1 X 10 fois = CV-intra 4
Gel 5: Échantillon 1 X 10 fois = CV-intra 5

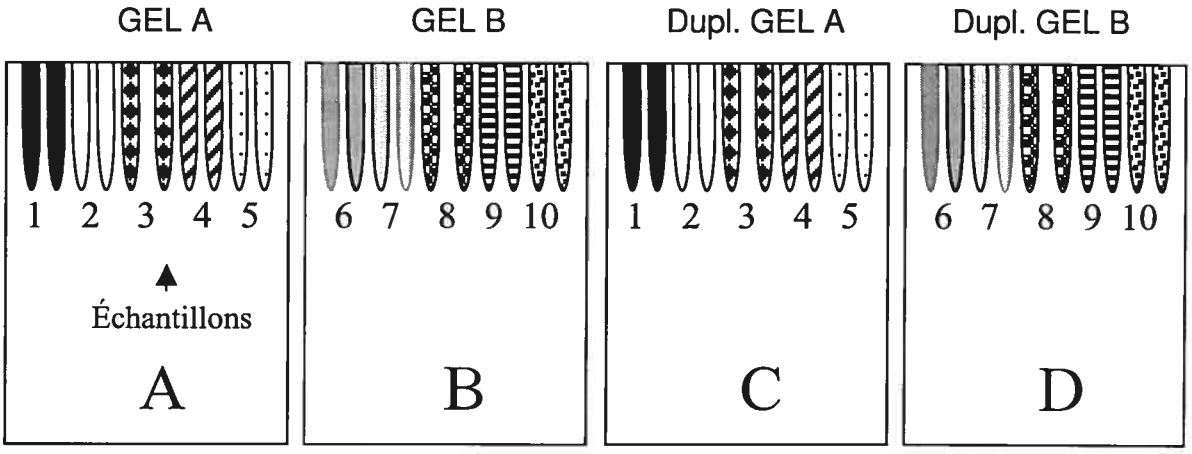
$$\frac{\Sigma\ CV}{5} = CV_{intra}$$

2) 2 lectures, simplicata.

Sur ces mêmes gels, lire les bandes DEUX fois, DEUX jours différents et pour chaque échantillon, nous utiliserons la moyenne des deux lectures pour calculer le CV-intra.

B) Détermination du CV INTER-GEL:

Faire cinq séries identiques, de deux gels chacune, en duplicata, à différents moments, sur lesquels on applique les dix échantillons, en duplicata, selon le schéma suivant :



...x 5 fois

1) 1 seule lecture, simplicata

Lire une seule fois la valeur de chacun des dix échantillons pour les cinq séries de gels et déterminer le coefficient de variation (CV).

2) 2 lectures, simplicata

Pour les mêmes puits, lire les valeurs DEUX fois, DEUX jours différents et nous utiliserons la moyenne de ces deux lectures pour calculer le CV.

3) Duplicatas

A) Duplicatas sur le même gel, une seule lecture:

Lire une seule fois, les valeurs des duplicatas se trouvant sur le même gel (A et B), pour les dix échantillons et pour les cinq séries

de gel. La moyenne de ces deux lectures est utilisée pour le calcul du CV.

B) Duplicatas sur le même gel, avec deux lectures :

Lire deux fois, les valeurs des duplicatas se trouvant sur le même gel (A et B), pour les dix échantillons et pour les cinq séries de gel. La moyenne de ces quatre lectures est utilisée pour le calcul du CV.

C) Duplicatas sur le des gels différents, avec une lecture :

Lire une seule fois, les valeurs des duplicatas se trouvant sur des gels différents (A et C), pour les dix échantillons et pour les cinq séries de gel. La moyenne de ces deux lectures est utilisée pour le calcul du CV.

D) Duplicatas sur le des gels différents, avec deux lectures :

Lire deux fois, les valeurs des duplicatas se trouvant sur le même gel (A et C), pour les dix échantillons et pour les cinq séries de gel. La moyenne de ces quatre lectures est utilisée pour le calcul du CV.

C) Vérification finale:

Prendre au moins 30 des échantillons de l'étude principale et les appliquer en duplicatas sur les gels différents. Procéder à deux lectures du même échantillon ainsi que des duplicatas, qui seront lus une ou deux fois. Ceci nous permettra de vérifier s'il est souhaitable de lire les données deux fois et s'il est nécessaire d'appliquer les échantillons en duplicata lors de l'analyse de l'ensemble des échantillons. Pour cette partie de l'analyse, nous appliquons également de manière systématique sur chaque gel, deux contrôles de qualité de tailles différentes, dont les valeurs nous indiqueront la reproductibilité de l'analyse globale.

Résultats :

Rapport concernant la determination du coefficient de variation

- Taille des LDL -

A) CV Intra-gel

1) Une seule lecture, simplicata.

Gels:	1	2	3	4	5
Echantillons	# 176	#159	#141	#84	#174
1	268.907	262.097	263.214	258.533	256.032
2	267.303	260.100	263.297	261.764	254.765
3	266.969	260.100	265.000	261.764	252.765
4	267.323	260.182	265.000	257.091	254.376
5	267.323	259.419	265.000	258.747	254.765
6	267.323	259.419	265.000	263.419	256.661
7	266.996	259.373	263.214	261.850	257.734
8	266.996	259.373	261.347	260.182	258.588
9	266.969	260.039	265.000	261.764	258.588
10	266.655	260.039	266.878	261.700	257.667
Sd	0.61	0.81	1.53	1.97	1.98
Moyenne	267.28	260.01	264.30	260.68	256.19
CV	*0.23*	*0.31*	*0.58*	*0.76*	*0.77*

CV-Intra-gel: *0.53*

2) 2 lectures, simplicata

Gels:	1			2			3			4			5		
Echantillons	# 176 A	# 176 B	Moyenne	#159 A	#159 B	Moyenne	#141 A	#141 B	Moyenne	#84 A	#84 B	Moyenne	#174 A	#174 B	Moyenne
1	268.907	268.433	268.670	262.097	263.306	262.702	263.214	263.214	263.214	258.533	258.533	258.533	256.032	256.032	256.032
2	267.303	266.700	267.002	260.100	260.100	260.100	263.297	262.834	263.066	261.764	261.764	261.764	254.765	254.765	254.765
3	266.969	266.969	266.969	260.100	261.225	260.663	265.000	265.000	265.000	261.764	261.764	261.764	252.765	252.806	252.786
4	267.323	266.969	267.146	260.182	260.182	260.182	265.000	265.000	265.000	257.091	257.091	257.091	254.376	254.447	254.412
5	267.323	266.969	267.146	259.419	258.482	258.951	265.000	265.000	265.000	258.747	257.734	258.241	254.765	256.245	255.505
6	267.323	266.969	267.146	259.419	259.482	259.451	265.000	265.000	265.000	263.419	263.419	263.419	256.661	256.725	256.693
7	266.996	266.969	266.983	259.373	259.419	259.396	263.214	262.802	263.008	261.850	261.764	261.807	257.734	257.829	257.782
8	266.996	266.655	266.826	259.373	259.419	259.396	261.347	260.679	261.013	260.182	260.100	260.141	258.588	259.482	259.035
9	266.969	266.655	266.812	260.039	260.100	260.070	265.000	265.000	265.000	261.764	261.700	261.732	258.588	259.482	259.035
10	266.655	266.655	266.655	260.039	260.100	260.070	266.878	265.000	265.939	261.700	262.097	261.899	257.667	257.667	257.667
Sd	0.61	0.53	0.56	0.81	1.31	1.04	1.53	1.51	1.49	1.97	2.12	2.04	1.98	2.16	2.06
Moyenne	267.28	266.99	267.14	260.01	260.18	260.10	264.30	263.95	264.12	260.68	260.60	260.64	256.19	256.55	256.37
CV %	*0.23*	*0.20*	*0.21*	*0.31*	*0.50*	*0.40*	*0.58*	*0.57*	*0.56*	*0.76*	*0.81*	*0.78*	*0.77*	*0.84*	*0.80*

CV-Intra-gel avec deux lectures: *0.55*

A) CV Inter-gel

1) Une seule lecture, simplicata

Gels: Echantillons	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
1 (#174)	254.818	257.667	257.829	257.091	257.734	1.27	257.03	*0.49*
2 (#84)	265.000	265.000	265.000	260.902	261.225	2.16	263.43	*0.82*
3 (#176)	267.716	266.878	267.168	265.000	266.655	1.02	266.68	*0.38*
4 (# 132)	265.000	261.850	268.789	265.000	263.085	2.63	264.74	*0.99*
5 (#159)	262.834	263.370	265.000	263.419	261.225	1.36	263.17	*0.51*
6 (#167)	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé
7 (#161)	265.000	265.000	265.000	261.225	265.000	1.69	264.25	*0.64*
8 (#113)	267.274	268.333	267.274	269.689	267.231	1.07	267.96	*0.40*
9 (#138)	256.661	258.624	258.588	256.032	265.000	3.56	258.98	*1.37*
10 (#141)	262.765	265.000	262.765	265.000	265.000	1.22	264.11	*0.46*

CV Inter-gel: *0.68*

2) 2 lectures, simplicata

Gels:	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echantillons	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2			generale	
1 (#174)	254.818	255.325	**255.07**	257.667	258.588	**258.13**	257.829	257.605	**257.72**	257.091	257.000	**257.05**	257.734	257.734	**257.73**	1.22	257.14	*0.47*
2 (#84)	265.000	265.000	**265.00**	265.000	265.000	**265.00**	265.000	265.000	**265.00**	260.902	260.771	**260.84**	261.225	261.276	**261.25**	2.17	263.42	*0.82*
3 (#176)	267.716	267.685	**267.70**	266.878	267.231	**267.05**	267.168	267.637	**267.40**	265.000	265.000	**265.00**	266.655	266.655	**266.66**	1.06	266.76	*0.40*
4 (# 132)	265.000	265.000	**265.00**	261.850	261.850	**261.85**	268.789	269.527	**269.16**	265.000	265.000	**265.00**	263.085	263.085	**263.09**	2.77	264.82	*1.05*
5 (#159)	262.834	262.403	**262.62**	263.370	263.370	**263.37**	265.000	265.000	**265.00**	263.419	263.115	**263.27**	261.225	261.225	**261.23**	1.37	263.10	*0.52*
6 (#167)	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé	Dégradé
7 (#161)	265.000	263.370	**264.19**	265.000	265.000	**265.00**	265.000	265.000	**265.00**	261.225	261.225	**261.23**	265.000	265.000	**265.00**	1.64	264.08	*0.62*
8 (#113)	267.274	266.655	**266.96**	268.333	268.198	**268.27**	267.274	266.803	**267.04**	269.689	269.689	**269.69**	267.231	267.231	**267.23**	1.16	267.84	*0.43*
9 (#138)	256.661	257.091	**256.88**	258.624	258.747	**258.69**	258.588	258.747	**258.67**	256.032	256.032	**256.03**	265.000	265.000	**265.00**	3.52	259.05	*1.36*
10 (#141)	262.765	263.085	**262.93**	265.000	265.000	**265.00**	262.765	263.419	**263.09**	265.000	265.000	**265.00**	265.000	265.000	**265.00**	1.09	264.20	*0.41*

CV Inter-gel avec deux lectures: *0.680*

3) 1 lecture, duplicata sur le même gel

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#174								
1A	254.818	257.667	257.829	257.091	257.734	1.27	257.03	*0.49*
1B	255.325	257.734	257.829	258.624	257.734	1.24	257.45	*0.48*
Moy. Gel 1	*255.072*	*257.701*	*257.829*	*257.858*	*257.734*	***1.21***	***257.24***	*0.47*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#84								
2A	265.000	265.000	265.000	260.902	261.225	2.16	263.43	*0.82*
2B	265.000	265.000	262.881	259.529	265.000	2.39	263.48	*0.91*
Moy. Gel 1	*265.000*	*265.000*	*263.941*	*260.216*	*263.113*	***1.98***	***263.45***	*0.75*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#176								
3A	267.716	266.878	267.168	265.000	266.655	1.02	266.68	*0.38*
3B	267.716	263.156	267.231	265.000	266.996	1.91	266.02	*0.72*
Moy. Gel 1	*267.716*	*265.017*	*267.200*	*265.000*	*266.826*	***1.27***	***266.35***	*0.48*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#132								
3A	265.000	261.850	268.789	265.000	263.085	2.63	264.74	*0.99*
3B	265.000	261.764	270.734	269.937	265.000	3.76	266.49	*1.41*
Moy. Gel 1	*265.000*	*261.807*	*269.762*	*267.469*	*264.043*	***3.08***	***265.62***	*1.16*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#159								
3A	262.834	263.370	265.000	263.419	261.225	1.36	263.17	*0.51*
3B	263.156	266.700	261.225	263.419	262.780	2.00	263.46	*0.76*
Moy. Gel 1	*262.995*	*265.035*	*263.113*	*263.419*	*262.003*	***1.10***	***263.31***	*0.42*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#161								
3A	265.000	265.000	265.000	261.225	265.000	1.69	264.25	*0.64*
3B	265.000	265.000	263.115	259.419	265.000	2.43	263.51	*0.92*
Moy. Gel 1	*265.000*	*265.000*	*264.058*	*260.322*	*265.000*	**2.03**	**263.88**	*0.77*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#113								
3A	267.274	268.333	267.274	269.689	267.231	1.07	267.96	*0.40*
3B	267.274	268.333	267.303	266.931	270.480	1.45	268.06	*0.54*
Moy. Gel 1	*267.274*	*268.333*	*267.289*	*268.310*	*268.856*	*0.70*	*268.01*	*0.26*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#138								
3A	256.661	258.624	258.588	256.032	265.000	3.56	258.98	*1.37*
3B	256.617	258.624	256.587	255.582	260.811	2.09	257.64	*0.81*
Moy. Gel 1	*256.639*	*258.624*	*257.588*	*255.807*	*262.906*	**2.77**	**258.31**	*1.07*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#141								
3A	262.765	265.000	262.765	265.000	265.000	1.22	264.11	*0.46*
3B	265.000	265.000	265.000	263.540	265.000	0.65	264.71	*0.25*
Moy. Gel 1	*263.883*	*265.000*	*263.883*	*264.270*	*265.000*	*0.56*	*264.41*	*0.21*

CV Inter-gel avec un duplicata sur le meme gel et une lecture: *0.62*

4) Deux lectures, duplicatas sur le même gel.

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
#174																		
1A	254.818	255.325	**255.072**	257.667	258.588	**258.128**	257.829	257.605	**257.717**	257.091	257.000	**257.046**	257.734	257.734	**257.734**	1.22	257.14	*0.47*
1B	255.325	255.325	**255.325**	257.734	257.734	**257.734**	257.829	257.605	**257.717**	258.624	258.533	**258.579**	257.734	257.734	**257.734**	1.23	257.42	*0.48*
Moy. Gel1	*255.072*	*255.325*	**255.198**	*257.701*	*258.161*	**257.931**	*257.829*	*257.605*	**257.717**	*257.858*	*257.767*	**257.812**	*257.734*	*257.734*	**257.734**	***1.17***	***257.28***	*0.45*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
#84																		
2A	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	260.902	260.771	**260.837**	261.225	261.276	**261.251**	2.17	263.42	*0.82*
2B	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	262.881	262.459	**262.670**	259.528	259.528	**259.528**	265.000	265.000	**265.000**	2.41	263.44	*0.91*
Moy. Gel1	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	263.941	263.730	**263.835**	260.215	260.150	**260.182**	263.113	263.138	**263.125**	***1.98***	***263.43***	*0.75*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
#176																		
3A	267.716	267.685	**267.701**	266.878	267.231	**267.055**	267.168	267.637	**267.403**	265.000	265.000	**265.000**	266.655	266.655	**266.655**	1.06	266.76	*0.40*
3B	267.716	267.231	**267.474**	263.156	263.156	**263.156**	267.231	267.168	**267.200**	265.000	265.000	**265.000**	266.996	266.969	**266.983**	1.85	265.96	*0.69*
Moy. Gel1	267.716	267.458	**267.587**	265.017	265.194	**265.105**	267.200	267.403	**267.301**	265.000	265.000	**265.000**	266.826	266.812	**266.819**	***1.23***	***266.36***	*0,46*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 132																		
4A	265.000	265.000	**265.000**	261.850	261.850	**261.850**	268.789	269.527	**269.158**	265.000	265.000	**265.000**	263.085	263.085	**263.085**	2.77	264.82	*1.05*
4B	265.000	265.000	**265.000**	261.764	261.850	**261.807**	270.734	270.461	**270.598**	269.937	270.036	**269.987**	265.000	263.333	**264.167**	3.82	266.31	*1.44*
Moy. Gel1	265.000	265.000	**265.000**	261.807	261.850	**261.829**	269.762	269.994	**269.878**	267.469	267.518	**267.493**	264.043	263.209	**263.626**	***3.18***	***265.57***	*1.20*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 159																		
5A	262.834	262.403	**262.619**	263.370	263.370	**263.370**	265.000	265.000	**265.000**	263.419	263.115	**263.267**	261.225	261.225	**261.225**	1.37	263.10	*0.52*
5B	263.156	262.802	**262.979**	266.700	266.969	**266.835**	261.225	261.850	**261.538**	263.419	263.085	**263.252**	262.780	263.064	**262.922**	1.98	263.51	*0.75*
Moy. Gel1	262.995	262.603	**262.799**	265.035	265.170	**265.102**	263.113	263.425	**263.269**	263.419	263.100	**263.260**	262.003	262.145	**262.074**	***1,12***	***263.30***	*0.42*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 161																		
6A	265.000	263.370	**264.185**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	261.225	261.225	**261.225**	265.000	265.000	**265.000**	1.64	264.08	***0.62***
6B	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	263.115	263.156	**263.136**	259.419	260.642	**260.031**	265.000	265.000	**265.000**	2.17	263.63	***0.82***
Moy. Gel1	265.000	264.185	**264.593**	265.000	265.000	**265.000**	264.058	264.078	**264.068**	260.322	260.934	**260.628**	265.000	265.000	**265.000**	***1.85***	***263.86***	***0.70***

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 113																		
7A	267.274	266.655	**266.965**	268.333	268.198	**268.266**	267.274	266.803	**267.039**	269.689	269.689	**269.689**	267.231	267.231	**267.231**	1.16	267.84	***0.43***
7B	267.274	266.655	**266.965**	268.333	268.198	**268.266**	267.303	266.878	**267.091**	266.931	266.931	**266.931**	270.480	270.480	**270.480**	1.52	267.95	***0.57***
Moy. Gel1	267.274	266.655	**266.965**	268.333	268.198	**268.266**	267.289	266.841	**267.065**	268.310	268.310	**268.310**	268.856	268.856	**268.856**	***0.83***	***267.89***	***0.31***

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 138																		
8A	256.661	257.091	**256.876**	258.624	258.747	**258.686**	258.588	258.747	**258.668**	256.032	256.032	**256.032**	265.000	265.000	**265.000**	3.52	259.05	***1.36***
8B	256.617	255.969	**256.293**	258.624	258.150	**258.387**	256.587	258.747	**257.667**	255.582	255.582	**255.582**	260.811	259.960	**260.386**	1.88	257.66	***0.73***
Moy. Gel1	256.639	256.530	**256.585**	258.624	258.449	**258.536**	257.588	258.747	**258.167**	255.807	255.807	**255.807**	262.906	262.480	**262.693**	***2.67***	***258.36***	***1.03***

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 141																		
9A	262.765	263.085	**262.925**	265.000	265.000	**265.000**	262.765	263.419	**263.092**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	1.09	264.20	***0.41***
9B	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	263.582	**264.291**	263.540	263.540	**263.540**	265.000	265.000	**265.000**	0.65	264.57	***0.25***
Moy. Gel1	263.883	264.043	**263.963**	265.000	265.000	**265.000**	263.883	263.501	**263.692**	264.270	264.270	**264.270**	265.000	265.000	**265.000**	***0.60***	***264.38***	***0.23***

CV Inter-gel avec un duplicata sur le meme gel et deux lectures: ***0.62***

5) 1 lecture, duplicatas sur des gels différents

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#174								
1A	254.818	257.667	257.829	257.091	257.734	1.27	257.03	*0.49*
1C	254.818	256.405	258.747	257.618	256.420	1.47	256.80	*0.57*
Moy. Gel 1	254.818	257.036	258.288	257.355	257.077	*1.28*	*256.91*	*0.50*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#84								
2A	265.000	265.000	265.000	260.902	261.225	2.16	263.43	*0.82*
2C	262.834	265.093	265.000	266.969	268.508	2.15	265.68	*0.81*
Moy. Gel 1	263.917	265.047	265.000	263.936	264.867	*0.58*	*264.55*	*0.22*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#176								
3A	267.716	266.878	267.168	265.000	266.655	1.02	266.68	*0.38*
3C	267.716	269.804	266.803	268.907	266.969	1.29	268.04	*0.48*
Moy. Gel 1	267.716	268.341	266.986	266.954	266.812	*0.65*	*267.36*	*0.24*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#132								
3A	265.000	261.850	268.789	265.000	263.085	2.63	264.74	*0.99*
3C	267.231	263.156	269.527	263.115	265.000	2.77	265.61	*1.04*
Moy. Gel 1	266.116	262.503	269.158	264.058	264.043	*2.57*	*265.18*	*0.97*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#159								
3A	262.834	263.370	265.000	263.419	261.225	1.36	263.17	*0.51*
3C	262.834	265.000	259.571	263.370	254.033	4.35	260.96	*1.67*
Moy. Gel 1	262.834	264.185	262.286	263.395	257.629	*2.58*	*262.07*	*0.98*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#161								
3A	265.000	265.000	265.000	261.225	265.000	1.69	264.25	*0.64*
3C	262.097	263.085	265.000	262.040	265.000	1.48	263.44	*0.56*
Moy. Gel 1	263.549	264.043	265.000	261.633	265.000	*1.39*	*263.84*	*0.53*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#113								
3A	267.274	268.333	267.274	269.689	267.231	1.07	267.96	*0.40*
3C	268.433	269.815	266.878	268.060	267.231	1.15	268.08	*0.43*
Moy. Gel 1	267.854	269.074	267.076	268.875	267.231	*0.92*	*268.02*	*0.34*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#138								
3A	256.661	258.624	258.588	256.032	265.000	3.56	258.98	*1.37*
3C	258.466	258.747	260.182	257.877	263.156	2.12	259.69	*0.82*
Moy. Gel 1	257.564	258.686	259.385	256.955	264.078	*2.82*	*259.33*	*1.09*

Gels(serie) Echant	1	2	3	4	5	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
#141								
3A	262.765	265.000	262.765	265.000	265.000	1.224	264.106	*0.46*
3C	265.000	266.655	263.064	266.292	263.115	1.700	264.825	*0.64*
Moy. Gel 1	263.883	265.828	262.915	265.646	264.058	*1.24*	*264.47*	*0.47*

CV Inter-gel avec un duplicata sur un gel different et une lecture: *0.59*

6) Deux lectures, duplicatas sur des gels différents.

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
#174																		
1A	254.818	255.325	**255.072**	257.667	258.588	**258.128**	257.829	257.605	**257.717**	257.091	257.000	**257.046**	257.734	257.734	**257.734**	1.22	257.14	*0.47*
1C	254.818	255.693	**255.256**	256.405	257.091	**256.748**	258.747	259.730	**259.239**	257.618	257.994	**257.806**	256.420	256.029	**256.225**	1.53	257.05	*0.59*
Moy. Gel1	254.818	255.509	**255.164**	257.036	257.840	**257.438**	258.288	258.668	**258.478**	257.355	257.497	**257.426**	257.077	256.882	**256.979**	*1.21*	*257.10*	*0.47*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
#84																		
2A	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	260.902	260.771	**260.837**	261.225	261.276	**261.251**	2.17	263.42	*0.82*
2C	262.834	263.156	**262.995**	265.093	263.370	**264.232**	265.000	265.000	**265.000**	266.969	266.593	**266.781**	268.508	267.975	**268.242**	2.08	265.45	*0.78*
Moy. Gel1	263.917	264.078	**263.998**	265.047	264.185	**264.616**	265.000	265.000	**265.000**	263.936	263.682	**263.809**	264.867	264.626	**264.746**	*0.51*	*264.43*	*0.19*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
#176																		
3A	267.716	267.685	**267.701**	266.878	267.231	**267.055**	267.168	267.637	**267.403**	265.000	265.000	**265.000**	266.655	266.655	**266.655**	1.06	266.76	*0.40*
3C	267.716	267.231	**267.474**	269.804	268.333	**269.069**	266.803	266.878	**266.841**	268.907	269.623	**269.265**	266.969	266.478	**266.724**	1.22	267.87	*0.45*
Moy. Gel1	267.716	267.458	**267.587**	268.341	267.782	**268.062**	266.986	267.258	**267.122**	266.954	267.312	**267.133**	266.812	266.567	**266.689**	*0.52*	*267.32*	*0.20*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 132																		
4A	265.000	265.000	**265.000**	261.850	261.850	**261.850**	268.789	269.527	**269.158**	265.000	265.000	**265.000**	263.085	263.085	**263.085**	2.77	264.82	*1.05*
4C	267.231	267.274	**267.253**	263.156	263.370	**263.263**	269.527	269.623	**269.575**	263.115	263.156	**263.136**	265.000	265.000	**265.000**	2.76	265.65	*1.04*
Moy. Gel1	266.116	266.137	**266.126**	262.503	262.610	**262.557**	269.158	269.575	**269.367**	264.058	264.078	**264.068**	264.043	264.043	**264.043**	*2.64*	*265.23*	*0.99*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	*Sd*	*Moyenne*	*CV %*
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 159																		
5A	262.834	262.403	**262.619**	263.370	263.370	**263.370**	265.000	265.000	**265.000**	263.419	263.115	**263.267**	261.225	261.225	**261.225**	1.37	263.10	*0.52*
5C	262.834	262.802	**262.818**	263.000	263.000	**263.000**	259.571	269.482	**264.527**	263.370	263.419	**263.395**	254.033	255.152	**254.593**	4.01	261.67	*1.53*
Moy. Gel1	262.834	262.603	**262.718**	263.185	263.185	**263.185**	262.286	267.241	**264.763**	263.395	263.267	**263.331**	257.629	258.189	**257.909**	*2.61*	*262.38*	*1.00*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 161																		
6A	265.000	263.370	**264.185**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	261.225	261.225	**261.225**	265.000	265.000	**265.000**	1.64	264.08	*0.62*
6C	262.097	263.540	**262.819**	263.085	263.486	**263.286**	265.000	265.000	**265.000**	262.040	261.653	**261.847**	265.000	265.000	**265.000**	1.39	263.59	*0.53*
Moy. Gel1	263.549	263.455	**263.502**	264.043	264.243	**264.143**	265.000	265.000	**265.000**	261.633	261.439	**261.536**	265.000	265.000	**265.000**	*1.43*	*263.84*	*0.54*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 113																		
7A	267.274	266.655	**266.965**	268.333	268.198	**268.266**	267.274	266.803	**267.039**	269.689	269.689	**269.689**	267.231	267.231	**267.231**	1.16	267.84	*0.43*
7C	268.433	268.333	**268.383**	269.815	269.511	**269.663**	266.878	266.878	**266.878**	268.060	268.508	**268.284**	267.231	267.168	**267.200**	1.10	268.08	*0.41*
Moy. Gel1	267.854	267.494	**267.674**	269.074	268.855	**268.964**	267.076	266.841	**266.958**	268.875	269.099	**268.987**	267.231	267.200	**267.215**	*0.96*	*267.96*	*0.36*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 138																		
8A	256.661	257.091	**256.876**	258.624	258.747	**258.686**	258.588	258.747	**258.668**	256.032	256.032	**256.032**	265.000	265.000	**265.000**	3.52	259.05	*1.36*
8C	258.466	258.533	**258.500**	258.747	258.916	**258.832**	260.182	260.182	**260.182**	257.877	256.932	**257.405**	263.156	262.834	**262.995**	2.15	259.58	*0.83*
Moy. Gel1	257.564	257.812	**257.688**	258.686	258.832	**258.759**	259.385	259.465	**259.425**	256.955	256.482	**256.718**	264.078	263.917	**263.998**	*2.81*	*259.32*	*1.08*

Gels(serie)	1		Moyenne	2		Moyenne	3		Moyenne	4		Moyenne	5		Moyenne	Sd	Moyenne	CV %
Echant	Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2		Lect. 1	Lect. 2				
# 141																		
9A	262.765	263.085	**262.925**	265.000	265.000	**265.000**	262.765	263.419	**263.092**	265.000	265.000	**265.000**	265.000	265.000	**265.000**	1.09	264.20	*0.41*
9C	265.000	265.000	**265.000**	266.655	266.593	**266.624**	263.064	262.097	**262.581**	266.292	266.548	**266.420**	263.115	262.802	**262.959**	1.89	264.72	*0.71*
Moy. Gel1	263.883	264.043	**263.963**	265.828	265.797	**265.812**	262.915	262.758	**262.836**	265.646	265.774	**265.710**	264.058	263.901	**263.979**	*1.28*	*264.46*	*0.48*

CV Inter-gel avec un duplicata sur un gel different et deux lectures: *0.59*

Étude du coefficient de variation avec les échantillons de Santé Québec (1-53)

A) Deux lectures, simplicata

Gels	G2002026		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
174	**256.03**	**255.97**	**0.04**	**256.00**	***0.02***
1	259.57	259.48	0.06	259.53	***0.02***
2	254.45	254.77	0.23	254.61	***0.09***
3	256.25	256.12	0.09	256.19	***0.04***
4	257.96	258.70	0.52	258.33	***0.20***
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
5	259.15	259.70	0.39	259.43	***0.15***
6	257.96	257.96	0.00	257.96	***0.00***
7	259.70	259.70	0.00	259.70	***0.00***
8	257.38	257.38	0.00	257.38	***0.00***

Gels	G2002027		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
9	261.70	261.70	0.00	261.70	***0.00***
174	**255.58**	**255.58**	**0.00**	**255.58**	***0.00***
10	257.09	257.09	0.00	257.09	***0.00***
11	257.09	257.00	0.06	257.05	***0.02***
12	254.18	254.10	0.06	254.14	***0.02***
13	265.00	265.00	0.00	265.00	***0.00***
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
14	263.42	263.42	0.00	263.42	***0.00***
15	263.42	263.42	0.00	263.42	***0.00***
16	263.42	263.42	0.00	263.42	***0.00***

Gels	G2002028		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
17	265.00	265.00	0.00	265.00	***0.00***
18	263.21	263.16	0.04	263.19	***0.01***
174	**258.70**	**259.70**	**0.71**	**259.20**	***0.27***
19	260.73	261.45	0.51	261.09	***0.19***
20	259.70	259.57	0.09	259.64	***0.04***
21	254.77	256.12	0.95	255.45	***0.37***
22	265.00	265.00	0.00	265.00	***0.00***
141	**272.05**	**270.73**	**0.93**	**271.39**	***0.34***
23	269.69	268.91	0.55	269.30	***0.20***
24	265.00	265.00	0.00	265.00	***0.00***

Gels	G2002029		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
26	259.48	259.57	0.06	259.53	***0.02***
27	257.73	257.83	0.07	257.78	***0.03***
28	261.35	261.45	0.07	261.40	***0.03***
174	**256.12**	**256.25**	**0.09**	**256.19**	***0.04***
29	259.57	259.7	0.09	259.64	***0.04***
30	257.96	257.96	0.00	257.96	***0.00***
31	261.97	261.97	0.00	261.97	***0.00***
32	261.35	261.35	0.00	261.35	***0.00***
141	**266.88**	**266.88**	**0.00**	**266.88**	***0.00***
33	257.21	257.21	0.00	257.21	***0.00***

Gels	G2002030		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
34	257.73	257.73	0.00	257.73	*0.00*
35	261.28	261.28	0.00	261.28	*0.00*
36	252.81	252.81	0.00	252.81	*0.00*
37	256.12	256.12	0.00	256.12	*0.00*
174	**252.98**	**252.98**	**0.00**	**252.98**	*0.00*
39	267.23	267.23	0.00	267.23	*0.00*
42	258.70	257.83	0.62	258.27	*0.24*
43	265.00	265.00	0.00	265.00	*0.00*
44	256.12	256.12	0.00	256.12	*0.00*
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	*0.00*

Gels	G2002031		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
174	**257.83**	**257.73**	**0.07**	**257.78**	*0.03*
45	261.35	261.28	0.05	261.32	*0.02*
46	256.12	256.03	0.06	256.08	*0.02*
47	254.45	254.45	**0.00**	**254.45**	*0.00*
48	256.12	256.12	0.00	256.12	*0.00*
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	*0.00*
49	252.81	252.81	0.00	252.81	*0.00*
51	257.83	256.12	1.21	256.98	*0.47*
52	255.84	255.84	**0.00**	**255.84**	*0.00*
53	266.88	266.88	0.00	266.88	*0.00*

Gels	G2002032		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
174	**256.12**	**256.12**	**0.00**	**256.12**	*0.00*
1	261.35	261.35	0.00	261.35	*0.00*
2	256.03	256.12	0.06	256.08	*0.02*
3	256.66	256.73	0.05	256.70	*0.02*
4	259.48	261.35	1.32	260.42	*0.51*
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	*0.00*
5	256.66	256.73	0.05	256.70	*0.02*
6	261.28	261.35	0.05	261.32	*0.02*
7	259.48	258.70	0.55	259.09	*0.21*
8	257.09	256.12	**0.69**	**256.61**	*0.27*

Gels	G2002033		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
9	261.97	261.97	**0.00**	**261.97**	*0.00*
174	**257.38**	**257.38**	0.00	257.38	*0.00*
10	259.70	259.57	0.09	259.64	*0.04*
11	260.44	260.44	**0.00**	**260.44**	*0.00*
12	254.55	254.45	0.07	254.50	*0.03*
13	261.45	261.35	**0.07**	**261.40**	*0.03*
141	**265.00**	**265.00**	0.00	265.00	*0.00*
14	263.16	263.16	0.00	263.16	*0.00*
15	263.16	263.16	**0.00**	**263.16**	*0.00*
16	263.16	263.16	0.00	263.16	*0.00*

Gels	G2002034		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
17	265.00	265.00	**0.00**	**265.00**	*0.00*
18	262.83	262.88	0.04	262.86	*0.01*
174	**257.61**	**256.73**	**0.62**	**257.17**	*0.24*
19	259.96	258.70	0.89	259.33	*0.34*
20	259.93	258.63	0.92	259.28	*0.35*
21	254.77	254.77	**0.00**	**254.77**	*0.00*
22	258.63	257.73	0.64	258.18	*0.25*
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	*0.00*
23	259.42	258.63	0.56	259.03	*0.22*
24	259.42	259.48	**0.04**	**259.45**	*0.02*

Gels	G2002035		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
26	260.67	260.67	**0.00**	**260.67**	*0.00*
27	257.52	257.52	0.00	257.52	*0.00*
28	260.67	259.27	0.99	259.97	*0.38*
174	**256.51**	**256.51**	**0.00**	**256.51**	*0.00*
29	261.28	261.16	0.08	261.22	*0.03*
30	258.78	258.63	**0.11**	**258.71**	*0.04*
31	263.54	263.51	0.02	263.53	*0.01*
32	260.03	259.90	0.09	259.97	*0.04*
141	**268.06**	**268.06**	**0.00**	**268.06**	*0.00*
33	257.38	257.38	0.00	257.38	*0.00*

Gels	G2002036		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
34	259.11	259.11	0.00	259.11	*0.00*
35	262.00	262.00	0.00	262.00	*0.00*
36	251.06	251.20	0.10	251.13	*0.04*
37	256.72	257.27	0.39	257.00	*0.15*
174	**256.72**	**256.27**	**0.32**	**256.50**	*0.12*
39	260.23	260.10	0.09	260.17	*0.04*
42	269.93	271.58	1.17	270.76	*0.43*
43	300.06	300.70	0.45	300.38	*0.15*
44	294.20	294.00	0.14	294.10	*0.05*
141	**301.36**	**301.36**	**0.00**	**301.36**	*0.00*

Gels	G2002037		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lect.			
174	**256.12**	**256.12**	**0.00**	**256.12**	*0.00*
45	261.35	261.35	0.00	261.35	*0.00*
46	256.25	256.25	0.00	256.25	*0.00*
47	257.96	257.96	**0.00**	**257.96**	*0.00*
48	259.70	259.70	0.00	259.70	*0.00*
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	*0.00*
49	263.16	263.16	0.00	263.16	*0.00*
51	258.75	258.75	0.00	258.75	*0.00*
52	255.25	254.18	**0.76**	**254.72**	*0.30*
53	265.00	265.00	0.00	265.00	*0.00*

B) Une seule lecture, duplicatas

Gels / Echantillons	G200202	G200203	Sd	Moyenne	CV
174	**256.03**	**256.12**	**0.06**	**256.08**	***0.02***
1	259.57	261.35	1.26	260.46	***0.48***
2	254.45	257.73	2.32	256.09	***0.91***
3	256.25	256.66	0.29	256.46	***0.11***
4	257.96	259.48	1.07	258.72	***0.42***
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
5	259.15	256.66	1.76	257.91	***0.68***
6	257.96	261.28	2.35	259.62	***0.90***
7	259.70	259.48	0.16	259.59	***0.06***
8	257.38	257.09	0.21	257.24	***0.08***

Gels / Echantillons	G200202	G200203	Sd	Moyenne	CV
17	265.00	265.00	0.00	265.00	***0.00***
18	263.21	262.83	0.27	263.02	***0.10***
174	**258.70**	**257.61**	**0.77**	**258.16**	***0.30***
19	260.73	259.96	0.54	260.35	***0.21***
20	259.70	259.93	0.16	259.82	***0.06***
21	254.77	254.77	0.00	254.77	***0.00***
22	265.00	258.63	4.50	261.82	***1.72***
141	**272.05**	**265.00**	**4.99**	**268.53**	***1.86***
23	269.69	259.42	7.26	264.56	***2.74***
24	265.00	259.42	3.95	262.21	***1.50***

Gels / Echantillons	G200203	G200203	Sd	Moyenne	CV
34	257.73	259.11	0.98	258.42	***0.38***
35	261.28	262.00	0.51	261.64	***0.19***
36	252.81	251.06	1.24	251.94	***0.49***
37	256.12	256.72	0.42	256.42	***0.17***
174	**252.98**	**256.72**	2.64	254.85	***1.04***
39	267.23	260.23	Probl. de migration pour cette		
42	258.70	269.93	partie du gel		
43	265.00	300.06			
44	256.12	294.20			
141	**265.00**	301.36			

Gels / Echantillons	G200202	G200203	Sd	Moyenne	CV
9	261.70	261.97	0.19	261.84	***0.07***
174	**255.58**	**257.38**	**1.27**	**256.48**	***0.50***
10	257.09	259.70	1.85	258.40	***0.71***
11	257.09	260.44	2.37	258.77	***0.92***
12	254.18	254.55	0.26	254.37	***0.10***
13	265.00	261.45	2.51	263.23	***0.95***
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
14	263.42	263.16	0.18	263.29	***0.07***
15	263.42	263.16	0.18	263.29	***0.07***
16	263.42	263.16	0.18	263.29	***0.07***

Gels / Echantillons	G200202	G200203	Sd	Moyenne	CV
26	259.48	260.67	0.84	260.08	***0.32***
27	257.73	257.52	0.15	257.63	***0.06***
28	261.35	260.67	0.48	261.01	***0.18***
174	**256.12**	**256.51**	**0.28**	**256.32**	***0.11***
29	259.57	261.28	1.21	260.43	***0.46***
30	257.96	258.78	0.58	258.37	***0.22***
31	261.97	263.54	1.11	262.76	***0.42***
32	261.35	260.03	0.93	260.69	***0.36***
141	**266.88**	**268.06**	**0.83**	**267.47**	***0.31***
33	257.21	257.38	0.12	257.30	***0.05***

Gels / Echantillons	G200203	G200203	Sd	Moyenne	CV
174	**257.83**	**256.12**	**1.21**	**256.98**	***0.47***
45	261.35	261.35	0.00	261.35	***0.00***
46	256.12	256.25	0.09	256.19	***0.04***
47	254.45	257.96	2.48	256.21	***0.97***
48	256.12	259.70	2.53	257.91	***0.98***
141	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
49	252.81	263.16	7.32	257.99	***2.84***
51	257.83	258.75	0.65	258.29	***0.25***
52	255.84	255.25	0.42	255.55	***0.16***
53	266.88	265.00	1.33	265.94	***0.50***

C) Deux lectures, duplicatas

Gels	G2002026		G2002032		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lec	1ere lect.	2eme lect.			
174	**256.03**	**255.97**	**256.12**	**256.12**	**0.08**	**256.04**	***0.03***
1	259.57	259.48	261.35	261.35	1.05	260.13	***0.41***
2	254.45	254.77	256.03	256.12	0.84	255.08	***0.33***
3	256.25	256.12	256.66	256.73	0.28	256.34	***0.11***
4	257.96	258.70	259.48	261.35	0.76	258.71	***0.29***
141	**265.00**	**265.00**	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
5	259.15	259.70	256.66	256.73	1.62	258.50	***0.63***
6	257.96	257.96	261.28	261.35	1.92	259.07	***0.74***
7	259.70	259.70	259.48	258.70	0.13	259.63	***0.05***
8	257.38	257.38	257.09	256.12	0.17	257.28	***0.07***

Gels	G2002027		G2002033		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lec	1ere lect.	2eme lect.			
9	261.70	261.70	261.97	261.97	0.16	261.79	***0.06***
174	**255.58**	**255.58**	**257.38**	**257.38**	**1.04**	**256.18**	***0.41***
10	257.09	257.09	259.70	259.57	1.51	257.96	***0.58***
11	257.09	257.00	260.44	260.44	1.96	258.18	***0.76***
12	254.18	254.10	254.55	254.45	0.24	254.28	***0.09***
13	265.00	265.00	261.45	261.35	2.05	263.82	***0.78***
141	**265.00**	**265.00**	**265.00**	**265.00**	**0.00**	**265.00**	***0.00***
14	263.42	263.42	263.16	263.16	0.15	263.33	***0.06***
15	263.42	263.42	263.16	263.16	0.15	263.33	***0.06***
16	263.42	263.42	263.16	263.16	0.15	263.33	***0.06***

Gels	G2002028		G2002034		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lec	1ere lect.	2eme lect.			
17	265.00	265.00	265.00	265.00	0.00	265.00	***0.00***
18	263.21	263.16	262.83	262.88	0.21	263.07	***0.08***
174	**258.70**	**259.70**	**257.61**	**256.73**	1.05	258.67	***0.40***
19	260.73	261.45	259.96	258.70	0.75	260.71	***0.29***
20	259.70	259.57	259.93	258.63	0.18	259.73	***0.07***
21	254.77	256.12	254.77	254.77	0.78	255.22	***0.31***
22	265.00	265.00	258.63	257.73	3.68	262.88	***1.40***
141	**272.05**	**270.73**	**265.00**	**265.00**	3.75	269.26	***1.39***
23	269.69	268.91	259.42	258.63	5.72	266.01	***2.15***
24	265.00	265.00	259.42	259.48	3.22	263.14	***1.22***

Probleme de migration pour cette partie du gel (G2002028)

Gels	G2002029		G2002035		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lec	1ere lect.	2eme lec	2eme lect.		
26	259.48	259.57	260.67	260.67	0.66	259.91	***0.25***
27	257.73	257.83	257.52	257.52	0.16	257.69	***0.06***
28	261.35	261.45	260.67	259.27	0.42	261.16	***0.16***
174	**256.12**	**256.25**	**256.51**	**256.51**	0.20	256.29	***0.08***
29	259.57	259.7	261.28	261.16	0.95	260.18	***0.37***
30	257.96	257.96	258.78	258.63	0.47	258.23	***0.18***
31	261.97	261.97	263.54	263.51	0.91	262.49	***0.35***
32	261.35	261.35	260.03	259.90	0.76	260.91	***0.29***
141	**266.88**	**266.88**	**268.06**	**268.06**	0.68	267.27	***0.25***
33	257.21	257.21	257.38	257.38	0.10	257.27	***0.04***

Gels	G2002030		G2002036		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lec	1ere lect.	2eme lect.			
34	257.73	257.73	259.11	259.11	**0.00**	**259.11**	***0.00***
35	261.28	261.28	262.00	262.00	0.00	262.00	***0.00***
36	252.81	252.81	251.06	251.20	0.10	251.13	***0.04***
37	256.12	256.12	256.72	257.27	0.39	257.00	***0.15***
174	**252.98**	**252.98**	**256.72**	**256.27**	0.32	256.50	***0.12***
39	267.23	267.23	260.23	260.10	Probleme de migration pour		
42	258.70	257.83	269.93	271.58	cette partie du gel.		
43	265.00	265.00	300.06	300.70			
44	256.12	256.12	294.20	294.00			
141	**265.00**	**265.00**	**301.36**	**301.36**			

Gels	G2002031		G2002037		Sd	Moyenne	CV
Echantillons	1ere lect.	2eme lec	1ere lect.	2eme lec	2eme lect.		
174	**257.83**	**257.73**	**256.12**	**256.12**	0.96	257.23	***0.37***
45	261.35	261.28	261.35	261.35	0.04	261.33	***0.02***
46	256.12	256.03	256.25	256.25	0.11	256.13	***0.04***
47	254.45	254.45	257.96	257.96	2.03	255.62	***0.79***
48	256.12	256.12	259.70	259.70	2.07	257.31	***0.80***
141	**265.00**	**265.00**	**265.00**	**265.00**	0.00	265.00	***0.00***
49	252.81	252.81	263.16	263.16	5.98	256.26	***2.33***
51	257.83	256.12	258.75	258.75	1.33	257.57	***0.52***
52	255.84	255.84	255.25	254.18	0.34	255.64	***0.13***
53	266.88	266.88	265.00	265.00	1.09	266.25	***0.41***

Resume des donnees

Echant.	*Deux lectures*	*Duplicatas*	*Dupl, deux lectures*
1	0.02	0.48	0.41
2	0.09	0.91	0.33
3	0.04	0.11	0.11
4	0.20	0.42	0.29
5	0.15	0.68	0.63
6	0.00	0.90	0.74
7	0.00	0.06	0.05
8	0.00	0.08	0.07
9	0.00	0.07	0.06
10	0.00	0.71	0.58
11	0.02	0.92	0.76
12	0.02	0.10	0.09
13	0.00	0.95	0.78
14	0.00	0.07	0.06
15	0.00	0.07	0.06
16	0.00	0.07	0.06
17	0.00	0.00	0.00
18	0.01	0.10	0.08
19	0.19	0.21	0.29
20	0.04	0.06	0.07
21	0.37	0.00	0.31
26	0.02	0.32	0.25
27	0.03	0.06	0.06
28	0.03	0.18	0.16
29	0.04	0.46	0.37
30	0.00	0.22	0.18
31	0.00	0.42	0.35
32	0.00	0.36	0.29
33	0.00	0.05	0.04
34	0.00	0.38	0.00
35	0.00	0.19	0.00
36	0.00	0.49	0.04
37	0.00	0.17	0.15
45	0.02	0.00	0.02
46	0.02	0.04	0.04
47	0.00	0.97	0.79
48	0.00	0.98	0.88
51	0.47	0.25	0.52
52	0.00	0.16	0.13
53	0.00	0.50	0.41
N	***40***	***40***	***40***
Moyenne	***0.04***	***0.33***	***0.26***
Min	***0.00***	***0.00***	***0.00***
Max	***0.47***	***0.98***	***0.88***
Mediane	***0.09***	***0.32***	***0.27***

N.B.: Les CV ont ete calcules en faisant abstraction des echantillons degrades, et ceux se trouvant sur une portion du gel pour laquelle la migration a ete problematique.

Controles internes utilises pour cette partie de l'etude: 174 et 141

No de gel	*CV 174*				*CV 141*		
	1ere lect.	2eme lec	Moyenne		1ere lect.	2eme lec	Moyenne
G2002026	256.03	255.97	**256.00**		265.00	265.00	**265.00**
G2002027	255.58	255.58	**255.58**		265.00	265.00	**265.00**
G2002028	258.70	259.70	**259.20**		272.05	270.73	**271.39**
G2002029	256.12	256.25	**256.19**		266.88	266.88	**266.88**
G2002030	252.98	252.98	**252.98**		265.00	265.00	**265.00**
G2002031	257.83	257.73	**257.78**		265.00	265.00	**265.00**
G2002032	256.12	256.12	**256.12**		265.00	265.00	**265.00**
G2002033	257.38	257.38	**257.38**		265.00	265.00	**265.00**
G2002034	257.61	256.73	**257.17**		265.00	265.00	**265.00**
G2002035	256.51	256.51	**256.51**		268.06	268.06	**268.06**
Moyenne	**256.49**	**256.50**	**256.49**		**266.20**	**266.07**	**266.13**
S.D.	**1.58**	**1.71**	**1.63**		**2.31**	**1.95**	**2.13**
C.V.	***0.61***	***0.67***	***0.64***		***0.87***	***0.73***	***0.80***

Tableau résumant les valeurs des coefficients de variation obtenus lors des différentes analyses :

Analyses	**CV (%)**
A) Coefficient de variation **INTRA-GEL**	
- Une lecture, simplicata	0.53
- Deux lectures, simplicata	0.55
B) Coefficient de variation **INTER-GEL**	
- Une seule lecture, simplicata	0.68
- Deux lectures, simplicata	0.68
- Une lecture, en utilisant des duplicatas appliqués sur le même gel	0.62
- Deux lectures, en utilisant des duplicatas appliqués sur le même gel	0.62
- Une lecture, en utilisant des duplicatas appliqués sur des gels différents	0.59
- Deux lectures, en utilisant des duplicatas appliqués sur des gels différents	0.59
C) Analyses avec 40 des échantillons de l'étude principale	
- Deux lectures	0.04
- Duplicatas, une seule lecture	0.33
- Duplicatas, deux lectures	0.26
- Contrôles de qualité	0.64 et 0.80

<u>Conclusions générales obtenues à partir de cette étude :</u>

1) Un grand nombre d'études vise une valeur du coefficient de variation global inférieure à 5%. Cependant, nous considérons cette valeur un peu trop élevée, considérant l'intervalle restreint entre les bornes inférieure et supérieure des valeurs des tailles possibles. Conséquemment, nous garderons 2% (ou ≈ **4** Å) en tant que limite du coefficient de variation possible. Au-delà ou en dessous des valeurs des contrôles internes obtenues en tenant compte de ces limites, le gel sera repris complètement. Peu importe la méthode utilisée, dans notre cas, le coefficient de variation ne dépasse pas 1%, une valeur beaucoup plus

petite que celles recueillies dans la littérature, ce qui montre que la méthode que nous utiliserons fait preuve de grande précision.

2) La variation est plus élevée pour les échantillons qui sont dégradés. À cet effet, on retrouve des coefficients de variation plus élevés pour les échantillons 159, 84, 161 et 138, qui démontrent, lors de la migration, une bande très large et diffuse, qui suggère un degré de dégradation plus ou moins avancé. Ainsi, pour avoir des données précises et reproductibles, il est essentiel de s'assurer que les échantillons ne sont aucunement dégradés. Par conséquent, lors de l'étude principale, pour tout échantillon pour lequel une bande étalée et diffuse sera obtenue l'analyse sera reprise.

3) Même si le coefficient de variation obtenu était relativement moins élevé en présence des duplicatas, lors de l'étude principale, il n'est pas nécessaire d'appliquer la totalité des échantillons deux fois. Par conséquent, nous avons convenu de ne faire des duplicatas que pour 1/20 des échantillons.

4) On peut remarquer qu'une deuxième lecture est en mesure d'améliorer légèrement la valeur du coefficient de variation et c'est pour cette raison que cette procédure a été retenue dans le cadre de l'étude principale.

5) D'autre part, deux contrôles internes (l'un d'une valeur élevée et l'autre, de valeur réduite) seront utilisés lors de l'étude principale et appliqués systématiquement sur chaque gel. Ils permettront de déterminer le coefficient de variation global de notre étude et d'indiquer toute anomalie relative à la migration.