



Étude de variations génétiques et épigénétiques de gènes candidats des complications métaboliques de l'obésité

Mémoire

Stéphanie Bégin

Maîtrise en nutrition
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Stéphanie Bégin, 2016

Étude de variations génétiques et épigénétiques de gènes candidats des complications métaboliques de l'obésité

Mémoire

Stéphanie Bégin

Sous la direction de :

Marie-Claude Vohl, directrice de recherche

Résumé

L'obésité est de nos jours un problème croissant à travers le monde. La morbidité qui y est associée est surtout reliée au développement des différentes composantes du syndrome métabolique (SMet), une constellation de facteurs de risque regroupant l'hypertension, la dyslipidémie (concentration faible de cholestérol des lipoprotéines à haute densité (C-HDL) et élevée de triglycérides (TG)), l'hyperglycémie et l'obésité. Cependant, certains sujets obèses demeurent métaboliquement sains. Les facteurs génétiques joueraient donc un rôle important dans le développement de l'obésité et de ses complications. Les facteurs épigénétiques semblent également y avoir des effets. L'analyse de tissu adipeux viscéral (TAV) a donc été réalisée pour mener à la découverte de plusieurs gènes différentiellement exprimés et méthylés entre les obèses atteints et non atteints par le SMet. Les deux gènes candidats *NMT1* et *DGKZ* font partie de ce groupe et leurs associations avec les composantes du SMet ont été testées. Leurs niveaux de méthylation et d'expression génique ont aussi été analysés.

Abstract

Obesity is now a major problem worldwide. Its associated morbidity is mostly related to the components of metabolic syndrome (MetS), a constellation of risk factors including hypertension, dyslipidemia (low HDL-C concentration and high concentration of TG), hyperglycemia and obesity. However, some obese subjects remain metabolically healthy. Genetic has thus been established as playing a major role in the development of obesity and its complications. Epigenetic factors may also be involved. The analysis of visceral adipose tissue (VAT) was thus done and led to the discovery of several differentially expressed and methylated genes between groups of obese affected and unaffected with MetS. The two candidate genes *NMT1* and *DGKZ* were part of these and their associations with components of MetS were tested, as well as their methylation and expression levels.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations et sigles	ix
Avant-propos	x
Introduction.....	1
Chapitre 1 : La problématique	3
1. Le syndrome métabolique.....	3
1.1 Définition.....	3
1.2 Obésité	4
1.3 Dyslipidémie	5
I. C-HDL	5
II. TG	6
1.4 Hyperglycémie	7
1.5 Hypertension.....	7
2. Les maladies cardiovasculaires et les mécanismes intermédiaires potentiels.....	8
2.1 Les maladies cardiovasculaires	8
2.2 Dysfonction du tissu adipeux.....	9
2.2.1 Adipocyte.....	10
2.2.2 Adipokines	10
I. Leptine	11
II. Adiponectine	11
2.2.3 Gras ectopique	12
2.3 Inflammation	12
2.3.1 Macrophages	12
2.3.2 Marqueurs pro-inflammatoires	13
I. TNF- α	13
II. IL-6	13
III. CRP.....	14
2.4 Résistance à l'insuline	14
3. Génétique du syndrome métabolique	15

3.1 Les gènes candidats	18
3.1.1 NMT1	18
3.1.2 DGKZ	18
4. Épigenétique du syndrome métabolique.....	19
5. Objectifs.....	23
5.1 Objectif général.....	23
5.2 Objectifs spécifiques	23
6. Hypothèses.....	24
6.1 Hypothèse générale	24
6.2 Hypothèses spécifiques	24
7. Méthodologie	25
7.1 Sélection des sujets	25
7.2 Sélection des gènes	25
7.3 Sélection des SNPs et génotypage	25
7.4 Analyse de la méthylation de l'ADN.....	26
7.5 Expression génique.....	26
7.6 Analyses statistiques.....	27
Chapitre 2 : L'impact des polymorphismes du gène NMT1 sur les composantes du syndrome métabolique chez les patients avec obésité sévère.	28
Chapitre 3 : L'allèle rare du SNP rs10838599 de DGKZ est associé avec un haut niveau de Cholestérol HDL chez les patients avec obésité sévère.	52
Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion	77
Bibliographie.....	80

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1: Critères du SMet selon le NCEP-ATPIII.	3
--	---

Chapitre 2

Table 1: Subjects' characteristics.....	46
Table 2: Genotype distribution and localization of selected <i>NMT1</i> SNPs.....	47
Table 3: Significant genotype differences identified between <i>NMT1</i> SNPs, subjects' characteristics, CRP, fasting glucose, lipid profile and blood pressure.	48
Table 4: Association of phenotype-associated SNPs with gene methylation levels.	50
Table 5: Correlation of gene methylation with gene expression levels for SNPs-associated CpG sites in a subset of 14 severely obese subjects.	51

Chapitre 3

Table 1: Subjects' characteristics.....	73
Table 2: Genotype distribution and localization of selected <i>DGKZ</i> SNPs.	74
Table 3: Significant genotype differences identified between <i>DGKZ</i> SNPs, subjects' characteristics, CRP, fasting glucose, lipid profile and blood pressure.	75
Table 4: Association of phenotype-associated SNP rs10838599 with gene methylation levels.	76

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1: Représentation d'un SNP.....	15
Figure 2: Représentation de l'ADN	15
Figure 3: Représentation de mécanismes épigénétiques	19

Liste des abréviations et sigles

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AGL	: Acides gras libres
AP	: Acide phosphatidique
AVC	: Accident vasculaire cérébral
CpG	: Dinucléotides cytosine-guanine
CRP	: Protéine C-réactive (<i>C-reactive protein</i>)
DAG	: Diacylglycérol
DGK	: Diacylglycérol kinase
DT2	: Diabète de type 2
C-HDL	: Cholestérol des lipoprotéines de haute densité
HMZ	: Homozygote
HTZ	: Hétérozygote
IL-6	: Interleukine 6
IMC	: Indice de masse corporelle
IUCPQ	: Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
C-LDL	: Cholestérol des lipoprotéines de faible densité
MCV	: Maladies cardiovasculaires
MAF	: Fréquence de l'allèle mineur (<i>Minor allele frequency</i>)
NCEP-ATPIII	: <i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
NMT1	: N-myristoyltransferase 1
OSCM	: Obésité sans complications métaboliques
RI	: Résistance à l'insuline
SMET	: Syndrome métabolique
SNP	: Site de polymorphisme
TAV	: Tissu adipeux viscéral
TG	: Triglycérides
TNF-a	: Facteur de nécrose tumorale alpha (<i>Tumor necrose factor-alpha</i>)
C-VLDL	: Cholestérol des lipoprotéines de très faible densité

Avant-propos

Ce mémoire est l'accomplissement de mes quatre sessions de maîtrise en nutrition à l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF) de l'Université Laval. Grâce à mes cours de sciences et à un stage durant mes études au secondaire, je me suis découvert un intérêt particulier pour le travail en laboratoire. Ensuite, après avoir obtenu mon baccalauréat en sciences biologiques à l'Université de Montréal, je souhaitais diriger mes études supérieures vers un domaine plus appliqué de la biologie. Ayant une passion pour la nutrition, l'option de poursuivre mes études dans ce domaine m'interpelaient énormément. C'est également grâce à des raisons personnelles que je me suis finalement retrouvée à Québec dans l'équipe du Dr Vohl.

J'ai donc entrepris mes études de deuxième cycle en Janvier 2015. Mon projet de maîtrise porte sur les variations génétiques et épigénétiques pouvant influencer les complications métaboliques de l'obésité. Il a mené à la publication de deux articles scientifiques. Le premier s'intitule *Impact of NMT1 gene polymorphisms on features of the metabolic syndrome among severely obese patients* en novembre 2015 dans le journal *Obesity Research - Open Journal* [1]. Le second article s'intitule *The rare allele of DGKZ SNP rs10838599 is associated with variability in HDL-cholesterol levels among severely obese patients* a été publié par la revue *Integrative Obesity and Diabetes* en mai 2016 [2]. Pour ces deux articles, j'ai réalisé les analyses statistiques et rédigé le manuscrit. Les réalisations que j'ai pu accomplir et les compétences que j'ai pu acquérir durant ma maîtrise me seront certainement très utiles pour ma vie professionnelle qui s'amorce.

J'ai grandement apprécié d'être accueillie dans l'équipe de Marie-Claude Vohl où j'ai pu relier ma formation de biologiste à ma passion pour la nutrition. Je tiens donc à remercier sincèrement ma directrice pour son accueil, sa confiance et sa disponibilité. Avoir pu travailler au sein de cette équipe sera toujours pour moi une véritable fierté.

Un merci particulier au coordonateur du projet Frédéric Guénard pour sa patience de m'avoir absolument tout expliqué et d'avoir répondu à mes nombreuses questions. Merci à tous les autres étudiants de l'équipe Vohl avec qui j'ai partagé notre bureau; Bénédicte L.-Tremblay, Hubert Cormier, Bénédicte Allam-Noul, Bastien Vallée-Marcotte, Juan de Toro Martin, Marianne Cormier, Alexandra Laliberté et Caroline

Lamy. Merci pour vos conseils, votre respect et votre présence. Merci également aux professionnels de recherche de l'équipe Catherine Raymond, Alain Houde et Véronique Garneau.

Le début de ma maîtrise a d'abord été un déménagement Montréal-Québec. Elle a donc été pour moi un apprentissage autant au point de vue académique que personnel. J'ai appris à me connaître énormément à travers les différentes épreuves et les différents succès qui se sont présentés à moi. Je garde de très précieux souvenirs de cette période de ma vie et j'ai maintenant adopté ma nouvelle ville. L'INAF a été pour moi un lieu de rencontres extraordinaires. Je tiens donc à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées dans ce nouveau milieu, qui ont rendu ma vie à Québec beaucoup plus agréable. Je sais que je m'enrichis grandement par les rencontres que je fais et ce fût le cas durant mes études graduées.

Finalement, merci à mon amoureux Marc-André pour son soutien et son écoute durant ma maîtrise, comme à chaque étape de notre vie que nous avons vécue ensemble. Merci aux membres de ma famille, mes parents André et Sylvie ainsi que ma sœur Gabrielle, qui m'ont offert en particulier deux inoubliables occasions de décrocher de mes études pour recharger les batteries.

Introduction

L'obésité est un problème de santé de plus en plus présent à travers le monde [3]. Au Canada, sa prévalence a doublé en 30 ans, représentant également de grandes dépenses pour le système de santé. Par exemple, elles étaient estimées à 6,0 milliards de dollars en 2006 [4] et on peut rapporter 8414 décès en 2004 au pays causés par l'obésité [5]. De 2000 à 2011, la proportion de Canadiens obèses a passé de 18% à 25,3% [6]. Il est donc impératif de comprendre l'étiologie des complications reliées à l'obésité pour pouvoir ralentir sa progression. La présence du syndrome métabolique (SMet), une constellation de facteurs de risques incluant 5 critères, peut expliquer la morbidité et la mortalité associées à l'obésité [7]. Cependant, 20% des individus présentant de l'obésité ne sont pas atteints par le SMet. Ce phénomène peut être expliqué par des mécanismes génétiques et épigénétiques [8]. En raison de l'hétérogénéité dans l'expression des composantes du SMet chez les individus sévèrement obèses, il est possible que certains patients aient un risque plus élevé d'en être touchés, alors que d'autres pourraient en être protégés. Les études présentées dans ce mémoire tentent donc d'expliquer l'étiologie hétérogène de l'obésité pour pouvoir prévenir son développement.

Lors d'une étude précédente réalisée par notre équipe, 489 gènes ont été établis comme différentiellement exprimés dans le tissu adipeux viscéral (TAV) des individus obèses atteints par le SMet (SMet+) par rapport à ceux non atteints (SMet-) [9]. Avec une seconde étude, les gènes différentiellement méthylés dans le TAV de ces deux groupes ont également été identifiés [10]. Entre 10 et 20 gènes candidats les plus prometteurs ont par la suite été sélectionnés selon trois critères : 1-) la différence d'expression supérieure à 2; 2-) plausibilité biologique selon le rôle du gène; 3-) validité des résultats (expression validée par qRT-PCR). Ces gènes contiennent des sites de polymorphismes (SNPs), pouvant être associés à différents phénotypes reliés aux complications cardiométaboliques. Ces SNPs peuvent également moduler des changements épigénétiques [11].

Les deux gènes candidats *NMT1* et *DGKZ* qui seront abordés dans le présent mémoire font partie du groupe plus restreint de gènes sélectionnés. Leur association au SMet a été analysée et y sera énoncée. *NMT1* a été observé comme surexprimé et hyperméthylé dans le TAV des individus SMet+ vs SMet-, alors que *DGKZ* y a été observé comme surexprimé et hypométhylé. Ces deux gènes ont été choisis conjointement pour ce projet car ils jouent des rôles similaires, soient dans le métabolisme des lipides. *NMT1* code pour une enzyme catalysant la réaction de myristoylation, une modification protéique pouvant survenir

pendant ou après la transcription des protéines [12]. Elle implique l'acide myristique, un acide gras saturé à 14 carbones [13]. Pour sa part, *DGKZ* code pour une enzyme catalysant l'interconversion du diacylglycérol (DAG) en acide phosphatidique (AP), deux intermédiaires lipidiques métaboliquement importants [14, 15].

Le présent mémoire est divisé en quatre chapitres. Le premier aborde la problématique du SMet et de toutes les caractéristiques qu'il regroupe. Il traite des maladies cardiovasculaires (MCV) qui y sont associées et des différents mécanismes les reliant potentiellement au SMet, ainsi que des facteurs génétiques et épigénétiques influençant son développement. Finalement, les objectifs, les hypothèses et la méthodologie du projet y sont également présentés. Les deuxième et troisième chapitres contiennent les deux articles traitant respectivement des associations de *NMT1* et *DGKZ* avec les composantes du SMet. Le premier a été publié dans le journal *Obesity Journal - Open Research*, tandis que le deuxième a été publié dans le journal *Integrative Obesity and Diabetes*. Le quatrième chapitre présente la discussion générale et les conclusions de ce projet.

Chapitre 1 : La problématique

1. Le syndrome métabolique

1.1 Définition

Le SMet est un regroupement de complications cardiométaboliques associées à l'obésité. Il inclut 5 critères : l'obésité (indice de masse corporelle (IMC) $\geq 35 \text{ kg/m}^2$), un taux élevé de triglycérides (TG) sanguins, un faible taux de cholestérol des lipoprotéines de haute densité (C-HDL) sanguin, de l'hypertension ainsi qu'un haut niveau de glucose à jeun (Tableau 1) [16]. Les personnes déterminées comme atteintes du SMet sont touchées par au moins 3 de ces critères [16]. Le SMet fait augmenter les risques de MCV [17] et de diabète de type 2 (DT2) [18], mais également d'apnée du sommeil, de maladie du foie gras, de syndrome des ovaires polykystiques, d'hyperuricémie et d'insuffisance rénale chronique [19]. À travers le monde, la prévalence du SMet est d'environ 20-40% selon les populations et augmente proportionnellement avec la prévalence de l'obésité [20].

Tableau 1: Critères du SMet selon le NCEP-ATPIII.

Phénotype	Valeur seuil
1. Tour de taille (cm)	>102
2. Cholestérol-HDL (C-HDL) (mmol/L)	<1.03
3. Triglycérides (TG) (mmol/L)	≥ 1.69
4. Glucose à jeun (mmol/L)	≥ 6.1
5. Pression artérielle (mmHg)	$\geq 130/85$
Pression systolique (mmHg)	≥ 130
Pression diastolique (mmHg)	≥ 85

Tableau tiré du NCEP-ATPIII [16].

L'hypothèse la plus acceptée pour expliquer l'apparition du SMet est qu'il serait d'abord initié par la résistance à l'insuline (RI) [21-23]. Le tissu adipeux résistant à l'insuline d'individus obèses va sécréter des acides gras non-estérifiés en excès qui ont la capacité de causer la RI dans d'autres tissus comme les tissus hépatiques et musculaires [24]. Ces conditions sont reliées au développement de l'hyperglycémie, de la dyslipidémie et de

l'hypertension [24]. Cependant, certains ne sont pas d'accord avec l'hypothèse de la RI, puisque une assez grande proportion (24-48%) des individus atteints par le SMet n'en sont pas atteints [25, 26]. Cela peut dépendre de la définition du SMet utilisée car la RI, les marqueurs inflammatoires, la pression artérielle et la concentration de glucose à jeun sont des éléments qui ne sont pas inclus dans toutes les définitions connues du SMet [27-30]. En effet, malgré l'augmentation de sa prévalence de manière alarmante dans le monde, certaines controverses persistent toujours au niveau de sa définition, de sa valeur clinique et de son statut de syndrome, vu l'absence d'une seule étiologie le définissant [24]. On peut en conclure que le SMet est un désordre hautement complexe qui peut être influencé par de nombreux facteurs et qui n'est toujours pas clairement défini jusqu'à maintenant.

Il a été évalué qu'environ 20% des personnes obèses ne sont touchées que par un ou deux critères du SMet, elles sont donc considérées comme métaboliquement saines [8]. C'est donc dire qu'il existe un phénotype d'obésité sans les complications de dyslipidémie, de RI, d'hypertension et d'inflammation, nommé l'obésité sans complications métaboliques (OSCM) [27, 31-33]. Les individus avec OSCM auraient des cellules adipeuses plus petites, une quantité moindre de macrophages infiltrés et un statut inflammatoire favorable [34]. Ils auraient un risque augmenté d'arrêt cardiaque, mais un risque significativement diminué du développement d'autres MCV [35] et du DT2 [36]. Vu l'existence d'OSCM, l'étiologie de l'obésité a été proposée comme grandement influencée par le code génétique. Mis à part des gènes pouvant moduler le développement du SMet, les déterminants comportementaux et nutritionnels pouvant influencer spécifiquement l'OSCM doivent aussi être clarifiés [37]. Une controverse au sujet de la stabilité dans le temps de l'OSCM demeure également. En effet, certains individus avec OSCM peuvent développer des complications cardiométaboliques au fil du temps pour être finalement considérés comme atteints par le SMet [38].

1.2 Obésité

L'obésité est un excès de poids entraîné par une surabondance calorique et l'inactivité physique, faisant significativement augmenter le risque de souffrir de MCV et du DT2 [3, 39]. De manière plus précise, l'obésité se développe lorsqu'un excès de TG se retrouve stocké dans le tissu adipeux et est libéré en acides gras libres (AGL) [40]. Ce processus est considéré comme normal, mais peut provoquer des effets indésirables du fait que le corps est plus apte à se défendre contre une perte excessive par rapport à une prise excessive de poids [41]. En effet, le stockage énergétique dans le tissu adipeux peut être considéré comme un avantage dans le processus de sélection naturelle, mais l'accumulation

de gras ectopique et l'obésité en découlant peuvent décidément avoir des conséquences nuisibles [42]. L'inflammation systémique est une répercussion du dépôt de gras viscéral des individus obèses, et mène à divers complications comme le DT2 [43].

L'obésité est un désordre de type multifactoriel [44, 45]. Elle peut être causée par une trop grande consommation d'aliments à haute densité énergétique et par un mode de vie sédentaire, mais également par un nombre variable de facteurs environnementaux, comportementaux et génétiques. C'est pourquoi un enfant souffrant d'obésité aura plus de chances de développer des MCV à l'âge adulte [46].

1.3 Dyslipidémie

Le métabolisme des lipides, ou plus précisément la dyslipidémie, joue un rôle central dans le développement du SMet [47]. La dyslipidémie inclut des hauts taux de TG, d'AGL et de cholestérol ainsi qu'un faible taux de C-HDL plasmatique [48]. Un état pro-inflammatoire et de l'athérosclérose sont des conséquences de la dyslipidémie [49]. Le développement de l'athérosclérose a été clairement relié au taux de cholestérol plasmatique. La concentration de cholestérol dans le sang est grandement influencée par la quantité de gras de la diète, plus précisément la quantité de gras saturés qui en est le principal déterminant [50]. Le tissu adipeux, les muscles et le foie sont les plus affectés par la dyslipidémie et leur dysfonctionnement peuvent conduire à la RI périphérique [51].

Inversement, la RI peut également induire la dyslipidémie [52]. L'insuline réprime la lipolyse dans les adipocytes en situation normale, ce qui n'a plus lieu lorsque la signalisation de l'insuline est altérée, augmentant les niveaux d'AGL circulants [53]. Cette situation pourrait également provenir d'une plus grande sécrétion hépatique de cholestérol des lipoprotéines de très faible densité (C-VLDL), associée à une augmentation du stress oxydatif, de l'inflammation et du dysfonctionnement endothélial [54].

I. C-HDL

D'après certaines études épidémiologiques, une hausse de C-HDL serait associée à une réduction du risque des MCV et était désignée comme «l'hypothèse du C-HDL» [55]. Cependant, cette hypothèse a été fortement controversée [55, 56]. Tout de même, le C-HDL possède plusieurs fonctions antiathérogènes en faisant du transport inverse de cholestérol et

en étant antioxydant et anti-inflammatoire [57-60]. Son état de prédicteur d'évènements cardiovasculaires demeure donc incontesté [55].

Le métabolisme du C-HDL est influencé par plusieurs facteurs environnementaux. L'obésité, le DT2, l'inflammation et le tabagisme tendent à faire diminuer la concentration de C-HDL, tandis que la consommation d'alcool, l'exercice, et certaines hormones pourraient la faire augmenter [61]. Selon des études analysant des jumeaux, les taux sanguins de C-HDL seraient autant déterminés par les facteurs génétiques que par les facteurs environnementaux [62]. La production de C-HDL dans le foie pourrait même être influencée par l'insuline. La condition de RI tend à faire réduire les niveaux de C-HDL mais à en faire augmenter la synthèse [63-65]. Les personnes ayant un faible taux de C-HDL sont souvent également résistantes à l'insuline et plus à risque de développer le DT2 [66, 67].

II. TG

Le stockage des TG dans les cellules adipeuses détermine la masse du tissu adipeux [68]. Leur surplus dans le sang, l'hypertriglycéridémie, est donc fortement favorisée par l'accumulation de gras viscéral [69]. La lipolyse suivie de l'oxydation menant à l'élimination des TG du tissu adipeux diminue lors de l'état d'obésité [70]. La combinaison de la grande quantité et de la faible élimination des TG contribue à son accumulation et aide au maintien de la grande quantité de masse adipeuse chez les individus obèses [70].

Environ 30% des adultes souffrent d'hypertriglycéridémie [71]. La même proportion est retrouvée pour ceux ayant des problèmes de santé cardiovasculaire, alors qu'elle grimpe à 50% pour les diabétiques [72, 73]. L'hypertriglycéridémie serait grandement conditionnée par la génétique, en interaction avec l'environnement ainsi qu'avec d'autres éléments non-génétiques [71, 74, 75]. Plusieurs facteurs influencent l'hypertriglycéridémie dont la diète, les TG y composant environ 98-99% des lipides [76].

L'association indépendante des TG avec le risque de MCV est plutôt controversée et difficile à vérifier de manière isolée, puisque l'hypertriglycéridémie implique une réduction du C-HDL et une augmentation du cholestérol des lipoprotéines de faible densité (C-LDL) [71, 77, 78]. Vu leur association, les recherches sur le C-HDL sont beaucoup plus nombreuses que celles sur les TG depuis 25 ans [78]. Toutefois, l'accumulation des TG dans les sites ectopiques est reliée à une plus grande concentration plasmatique d'AGL ainsi qu'à la RI, l'intolérance au glucose et l'hypertension [67]. Les autres altérations du profil lipidique

pourraient toutes être des conséquences de l'hypertriglycéridémie [79]. La mesure de la concentration de TG peut même servir à estimer les niveaux de C-LDL [80, 81], qui sont aussi fortement associés au développement des MCV [82].

1.4 Hyperglycémie

Un taux de glucose à jeun plus élevé que 100 mg/dl fait partie des critères de diagnostic du SMet selon le NCEP-ATP III [16]. L'hyperglycémie est entre autres une conséquence d'un mode de vie sédentaire, de prédispositions génétiques et de l'obésité. En combinaison avec une augmentation des AGL dans le corps, cela peut mener à l'hyperinsulinémie et à l'augmentation du stress oxydatif systémique. Ces conditions peuvent inhiber le transport de glucose, qui pourra ensuite induire la RI [83]. La RI est définie comme étant une sécrétion normale ou augmentée de l'insuline tandis que ses effets biologiques sont atténués [84]. La diminution de la prise du glucose par les tissus musculaire, adipeux et hépatique causée par la RI mènera à l'élévation de sa concentration sanguine, et donc à l'hyperglycémie [24]. Le DT2 est également un trouble de santé qui peut en découler, puisque les cellules bêta du pancréas produisant l'insuline peuvent devenir défaillante à force d'être trop sollicitées [24].

Une exposition à l'hyperglycémie à long-terme peut causer des changements épigénétiques, qui pourraient même persister suite à un retour à un taux de glucose sanguin normal [85]. Elle peut aussi entraîner le développement du DT2 à cause d'une augmentation du stress oxydatif causé par une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène par les mitochondries, qui entraîne également des complications cardiovasculaires [86, 87]. La production de dérivés réactifs de l'oxygène est une conséquence de la toxicité du glucose, par le biais de mécanismes variés [88, 89].

1.5 Hypertension

L'élévation des tensions artérielles systoliques et diastoliques est un phénomène apparaissant avec l'âge, augmentant les risques de troubles cardiovasculaires [90]. Également, l'accumulation de gras abdominal est reliée à l'hypertension. Aussi, l'hypertension est fortement associée à chacune des différentes MCV incluant l'accident vasculaire cérébral (AVC) et l'arrêt cardiaque, pour lesquelles elle est déterminée comme l'élément déclencheur principal [91, 92]. Il est donc rare qu'elle apparaisse de manière isolée. La perte de poids peut réduire le risque d'apparition de ces complications [93], surtout si l'exercice physique est combiné à des changements alimentaires [94]. Les facteurs

génétiques, environnementaux et même les origines sociales seraient des causes potentielles d'hypertension, mais les mécanismes exacts ne sont pas encore complètement élucidés [92, 95].

L'hypertension pourrait être reliée à la RI, puisqu'on retrouve chez les gens souffrant d'hypertension des niveaux d'insuline à jeun et postprandiaux plus élevés que la normale [96, 97]. Le lien entre les deux passerait possiblement par l'entremise du système rénine-angiotensine-aldostérone, ce dernier étant activé par l'hyperglycémie ainsi que par l'hyperinsulinémie, et influençant au final la tension artérielle [98].

2. Les maladies cardiovasculaires et les mécanismes intermédiaires potentiels

2.1 Les maladies cardiovasculaires

Selon l'OMS, les MCV comprennent les cardiopathies coronariennes (infarctus), les AVC, les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales, l'insuffisance cardiaque, les cardiomyopathies, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires [99]. L'athérosclérose est responsable de la grande majorité des cas de MCV dans le monde [100]. Elle résulte d'un changement complexe dans les parois artérielles, découlant d'une infiltration accrue de cellules inflammatoires et de facteurs de coagulation. La dysfonction des cellules endothéliales de ces vaisseaux sanguins initie l'athérosclérose [101]. Son développement est dû à l'exposition répétée des parois des artères avec divers facteurs pathogéniques, dont un haut niveau circulant de C-LDL [102].

Les MCV regroupent les principales causes de décès à travers le monde, occasionnant environ 17,3 millions de décès par année [103]. Chez les diabétiques, 65% des décès sont dus aux MCV [87]. De nombreuses hypothèses, concernant le stress oxydatif, l'hyperglycémie, l'obésité ou l'inflammation, tentent de faire le lien entre ces deux problèmes sans toutefois fournir les preuves convaincantes [83]. Les principaux facteurs de risque pour les MCV sont l'hypertension, le tabagisme, le diabète et la dyslipidémie [104]. L'athérosclérose ainsi que les MCV sont donc influencées par les facteurs génétiques et environnementaux [105].

2.2 Dysfonction du tissu adipeux

Le tissu adipeux regroupe les tissus adipeux brun et blanc, métaboliquement semblables. Le blanc toutefois emmagasine de l'énergie alors que le brun la dépense. Également, le tissu adipeux blanc peut être subdivisé en tissus sous-cutané et TAV [106]. Le tissu adipeux sous-cutané, trois à quatre fois plus important dans le corps que le TAV [107], sert à entreposer le surplus de gras tandis que le TAV alimente les autres organes en énergie [106]. Le rôle majeur dans le développement du SMet appartient au TAV vu que le métabolisme des AGL y est grandement altéré et qu'il possède des fonctions endocrines [106]. La contribution du tissu adipeux sous-cutané abdominal n'y est cependant pas nulle, puisque les AGL sembleraient y être produits en plus grande quantité [108].

Une accumulation de plus en plus grande de gras mènerait à la transition de son dépôt de la partie sous-cutanée vers la partie viscérale du tissu adipeux. Une sécrétion accrue de cytokines, d'AGL et de marqueurs pro-inflammatoires, incluant le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6) et la protéine C-réactive (CRP), en découlerait [109, 110]. L'inflammation localisée dans le tissu adipeux pourra ensuite se propager pour devenir une inflammation systémique, associée à l'obésité et au développement de ses complications métaboliques [111]. La production par lipolyse d'AGL serait deux fois plus élevée chez les personnes obèses que chez les personnes maintenant un poids santé [106, 108].

Plusieurs types de cellules composent le tissu adipeux, incluant les adipocytes et préadipocytes, les cellules immunitaires, les cellules souches ainsi que les cellules endothéliales, en proportion de 50% pour les adipocytes et 50% pour les autres [112, 113]. Une plus grande abondance de cellules reliées aux réactions inflammatoires dans le tissu adipeux peut mener à la RI et aux complications métaboliques reliées à l'obésité [114]. Au niveau moléculaire, les récepteurs Toll-like sur les macrophages du tissu adipeux vont être activés par l'excès de gras et vont sécréter le TNF- α . Cela va enclencher des cascades de signalisation dans la cellule qui vont diminuer la régulation du récepteur de l'insuline, ce qui peut favoriser la RI à long-terme [115, 116]. La translocation du transporteur de glucose GLUT4 sera inhibée et il y aura une diminution d'absorption du glucose stimulée par l'insuline [117].

2.2.1 Adipocyte

L'adipocyte est une cellule très complexe, impliquée dans la synthèse des lipides et dans leur entreposage. Elle sert à la fois à définir le tissu adipeux de réservoir d'énergie et d'organe endocrine, puisqu'elles excrètent des adipokines [118]. Dans des conditions normales, elles peuvent sécréter des molécules anti-inflammatoires [106] alors que lors d'une situation d'obésité, elles peuvent être emmenées à produire des molécules pro-inflammatoires, favorisant ainsi l'inflammation et la RI [119]. La sécrétion d'adipokines est augmentée avec une élévation du nombre et de la taille des adipocytes. Vu l'influence de ces hormones entre autres sur la sensibilité à l'insuline et sur le métabolisme du glucose, elles pourraient aussi être associées au développement du DT2 [120-123].

Lors d'une accumulation excessive de gras, les adipocytes vont soit accroître en taille (hypertrophie) ou en nombre (hyperplasie) [124] de manière rapide et dynamique [125]. Une hypoxie du tissu adipeux pourrait en résulter, ce qui causerait une plus grande nécrose dans le tissu et une infiltration plus importante de macrophages [109, 126]. Le nombre d'adipocytes du tissu adipeux est déterminé au début de l'âge adulte. Les changements de masse grasseuse seront attribuables plutôt à un accroissement de leur taille, ces cellules ayant la capacité de s'étirer jusqu'à contenir 0.8 µg de lipides [127, 128]. Cependant, si cette limite est atteinte, une augmentation du nombre de cellules pourra être observée [127]. L'hypertrophie est plus fortement corrélée à la RI comparativement à tous les autres facteurs reliés à l'obésité [129]. Les adipocytes de plus forte taille seront plus résistants à l'insuline en plus de sécréter davantage de cytokines et moins d'adiponectine [130]. L'hyperplasie des cellules adipeuses serait moins dommageable et ne serait pas associée à l'obésité, et pourrait représenter une explication possible quant à la présence des individus avec OSCM [131, 132].

2.2.2 Adipokines

Les adipokines sont des molécules sécrétées par le tissu adipeux, jouant le même rôle qu'une hormone [133]. On les dénombre à plus de 600 [118] et elles servent à la régulation de plusieurs voies métaboliques [133]. La leptine a été la première adipokine découverte et serait presque exclusivement sécrétée par les adipocytes [134].

L'obésité est ce qui influence principalement les niveaux sanguins d'adipokines [122]. La sécrétion altérée des adipokines pourrait donc mener au développement de l'obésité et des MCV [133]. La sensibilité à l'insuline, le stress oxydatif, le métabolisme énergétique, la

coagulation sanguine et la réponse inflammatoire sont des évènements régulés par les adipokines, qui transmettent leurs signaux de manière autocrine, endocrine ou paracrine [135-137]. Une altération dans le métabolisme des AGL résulterait en un changement au niveau de la sécrétion des adipokines, ce qui mènerait ensuite à de l'hypertension et à d'autres problèmes cardiovasculaires [52].

I. Leptine

La leptine a été découverte en 1994 et a mené à l'établissement du tissu adipeux comme organe endocrine [138]. Elle aurait un effet sur le contrôle de la satiété et sur la prise alimentaire [109]. La résistance à la leptine, étant un niveau circulant de leptine sans effet de suppression sur la prise alimentaire, pourrait être un désordre fondamental de l'obésité [139]. Cette situation est observée chez la plupart des individus obèses. Une augmentation de sa concentration sanguine serait proportionnelle à l'adiposité [140, 141]. De plus, elle activerait le système nerveux sympathique [140] et tendrait à faire augmenter de cette manière la pression artérielle [142]. Elle pourrait même avoir un effet sur la longévité ainsi que sur la survie des cellules-beta du pancréas [143]. Son taux est élevé chez les personnes atteintes du DT2 et cette condition a été associée aux MCV [144].

II. Adiponectine

L'adiponectine est une autre adipokine, qui à l'inverse de la leptine est présente en quantité réduite chez les individus obèses, puisqu'elle est anti-inflammatoire [145]. Elle est alors plus exprimée chez les personnes n'ayant pas un surplus de poids, ses niveaux circulants étant normalement plutôt élevés [106]. Elle serait négativement corrélée au BMI [146], à l'adiposité viscérale [106] et à la pression artérielle, ainsi qu'aux niveaux de C-LDL et de TG [147]. Ses taux seraient diminués en présence de RI et de DT2, elle mènerait même à une augmentation de la sensibilité à l'insuline par le biais de son activité paracrine sur les adipocytes et les cellules hépatiques [148-150]. Elle aurait comme rôles de réguler le métabolisme des lipides et du glucose ainsi que de moduler l'apport alimentaire et le poids corporel [151]. Des tissus comme ceux du cœur, des muscles et des vaisseaux sanguins bénéficient des effets de l'adiponectine [152-154]. Une réduction de l'adiponectine est associée à une hausse des risques de MCV [155, 156].

2.2.3 Gras ectopique

Le gras ectopique correspond aux TG entreposés dans les cellules qui ne sont pas des adipocytes. Ces différentes cellules contiennent habituellement une très petite quantité de lipides [106]. Le gras ectopique va surtout s'accumuler dans le foie, les muscles squelettiques, le pancréas, les reins et le muscle cardiaque, où il sera un grand prédicteur du développement de la RI, du DT2 et des MCV [157-159]. Une accumulation des TG dans les sites ectopiques est une conséquence de la hausse du niveau circulant d'AGL [157] ainsi qu'une cause de l'inflammation et de la dysfonction du tissu adipeux [160].

2.3 Inflammation

La réponse inflammatoire est une réaction du corps pour se protéger contre des maladies et des infections. Cependant, elle peut être dérégulée et apporter des effets indésirables à son hôte [161]. Elle est une composante importante de l'état de santé des individus obèses [133]. Le tissu adipeux y est donc particulièrement important, les adipocytes y sécrétant plusieurs molécules stimulant ou inhibant l'inflammation [134]. Par le biais de la sécrétion des différentes adipokines, le tissu adipeux peut transmettre aux autres organes son état d'inflammation [132].

L'obésité et les complications métaboliques associées au SMet pourraient être reliées par l'activation du système immunitaire et la présence d'inflammation chronique de faible niveau [17, 88, 135]. L'inflammation chronique de faible niveau est causée par l'expansion du tissu adipeux due à l'infiltration de macrophages [136]. Elle est à la fois une cause et une conséquence de l'état inflammatoire systémique chronique [137]. Les différentes cytokines impliquées dans cet événement physiologique peuvent être sécrétées à la fois par les adipocytes et les macrophages [138]. De plus, le développement de la RI est intimement relié à l'inflammation du tissu adipeux [139].

2.3.1 Macrophages

Dans le tissu adipeux, on peut retrouver deux types de macrophages, soient les résidents et les inflammatoires [80]. Les macrophages sont plus nombreux dans le TAV que dans le sous-cutané chez les personnes sévèrement obèses [140]. L'hypertrophie des adipocytes semblerait être l'évènement initiant l'infiltration des monocytes et des macrophages, puisqu'il augmente le stress oxydatif ainsi que la sécrétion des AGL et des cytokines [141, 142]. Ce sont d'abord sous la forme de monocytes que les macrophages

vont intégrer le tissu adipeux, par la voie d'un mécanisme complexe [138], pour ensuite se différencier en macrophage inflammatoire [80]. Ceux-ci représentent une source importante de cytokines pro-inflammatoires et ils agiront en combinaison avec les adipocytes pour amplifier l'inflammation locale [143]. De plus, 90% des macrophages retrouvés dans le tissu adipeux se situeraient en périphérie des adipocytes en nécrose, qui sont beaucoup plus nombreux chez les personnes obèses [126]. En effet, la nécrose des cellules adipeuses favoriserait l'infiltration des macrophages, et une corrélation existerait entre la mort de ces cellules et leur taille [126].

2.3.2 Marqueurs pro-inflammatoires

Les différents marqueurs pro-inflammatoires sont originaires des macrophages infiltrant le tissu adipeux [162]. Une augmentation de leur abondance dans le tissu adipeux est caractéristique de son expansion [89] et de la présence de désordres métaboliques [91]. L'hypertrophie des adipocytes est associée à une plus grande sécrétion des marqueurs pro-inflammatoires [163]. Elle est également associée avec le tabagisme et positivement corrélée à l'IMC et aux niveaux de CRP [164-166]. Les gènes codant pour ces marqueurs seraient plus exprimés dans le tissu adipeux des individus atteints du DT2 [167].

I. TNF- α

Le TNF- α est un médiateur paracrine qui induirait l'apoptose des adipocytes et qui est positivement relié à la masse corporelle, au tour de taille et au taux de TG [168]. Sa découverte dans le tissu adipeux a établi le premier lien entre l'inflammation chronique et l'obésité [169]. Il s'agirait du médiateur d'inflammation le plus important [170]. Il affecte négativement la sensibilité à l'insuline des adipocytes en inhibant la transmission du signal de son récepteur [109, 171], en plus de promouvoir la lipolyse et d'augmenter la sécrétion des AGL [172]. Le TNF- α fait aussi diminuer les niveaux d'adiponectine et a une influence sur plusieurs composantes physiologiques comme les taux lipidiques, la coagulation, l'inflammation et l'athérosclérose [109]. Ses concentrations sanguines seraient corrélées avec l'obésité globale [173].

II. IL-6

L'IL-6 est sécrétée par les adipocytes, mais également par les muscles squelettiques et plusieurs régions du cerveau, où il peut avoir un effet sur la prise et la dépense énergétique [174, 175]. Elle provoque des réactions inflammatoires non seulement dans le

tissu adipeux, mais également dans le foie et les cellules endothéliales [176]. Comme TNF- α , elle favorise la lipolyse et la sécrétion des AGL [172]. Elle a été positivement associée avec l'IMC ainsi qu'au niveau d'insuline à jeun et négativement associée au C-HDL [177-179]. Cette adipokine diminuerait la sensibilité à l'insuline, en interférant dans sa signalisation, et ferait augmenter la production hépatique de CRP [179]. Ses taux en circulation seraient reliés à l'adiposité viscérale et serait impliqués dans l'état d'hyperinsulinémie relié au surplus de gras viscéral [173].

III. CRP

La CRP est une protéine de phase aiguë, c'est-à-dire que sa concentration plasmatique augmente ou diminue en réponse à l'inflammation. Ses changements de niveaux sanguins pourraient être causés par des facteurs environnementaux [180] et par des facteurs génétiques, dont plusieurs sont reconnus [181, 182]. Elle peut être considérée comme un prédicteur des risques cardiovasculaires associés au SMet [183]. Également, l'obésité contribuerait à la hausse des niveaux de CRP [184]. L'hyperglycémie, un tour de taille et un IMC élevé sont associés à des niveaux élevés de CRP [185-187]. Ses niveaux augmentent également avec le nombre de critères du SMet et tendraient à être moins élevés chez les individus obèses sensibles à l'insuline par rapport à ceux résistants à l'insuline [188]. Cependant, le lien causal de la CRP avec le développement de l'athérosclérose est toujours controversé [189-191].

2.4 Résistance à l'insuline

La RI serait pour plusieurs l'élément expliquant la physiopathologie du SMet, conduisant au développement de l'intolérance au glucose et des MCV [21-24]. Compte tenu de son implication dans plusieurs processus physiologiques essentiels comme la stimulation du transport du glucose, la synthèse du glycogène et des protéines, l'inhibition de la lipolyse, la régulation de la transcription et de la traduction ainsi que la croissance et la prolifération cellulaire [192-194], la dysfonction de la signalisation de l'insuline a des répercussions à plusieurs endroits. L'hypertension est également nettement reliée à la RI [96]. Une augmentation de la lipolyse des TG stockés dans le tissu adipeux peut être causée par cette condition, causant un surplus d'AGL, vu que la lipolyse est très sensible à la signalisation par l'insuline [195]. Elle peut également provoquer l'augmentation de la présence des cellules pro-inflammatoires dans le tissu adipeux [114], en plus d'abaisser les niveaux d'adiponectine [150]. Inversement, la sécrétion accrue des cytokines par les

macrophages infiltrant le tissu adipeux en plus du stress oxydatif peuvent aussi induire la RI [196].

3. Génétique du syndrome métabolique

La génétique étudie la science des gènes. Sa base est l'acide désoxyribonucléique (ADN) composée de 4 nucléotides qui sont l'adénine (A), la cytosine (C), la thymine (T) et la guanine (G) (Figure 1). Grâce à la transcription et la traduction, elle mène à la production des protéines [197] qui remplissent une multitude de fonctions dans l'organisme pour assurer son maintien. Les mutations sont des changements qui peuvent survenir dans la séquence des bases nucléotidiques de manière aléatoire. Un SNP est un site précis où une variation d'un seul nucléotide peut survenir et ainsi faire varier la séquence nucléotidique d'un individu à l'autre (Figure 2). Ce phénomène entraîne donc de la variabilité interindividuelle pour de multiples phénotypes, c'est-à-dire la manifestation observable du génotype. Certaines maladies sont causées par la mutation d'un seul SNP et sont dites monogéniques. D'autres, influencées par plusieurs facteurs génétiques et également par des facteurs environnementaux sont désignées comme multifactorielles, telles l'obésité et le SMet. Il est donc complexe de comprendre ce type de maladie et de définir leur étiologie moléculaire.

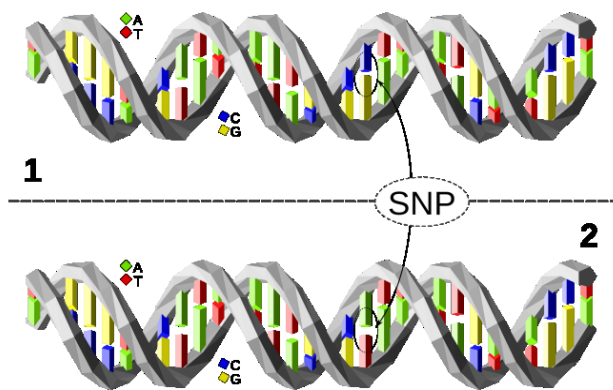


Figure 1: Représentation d'un SNP

Les chiffres 1 et 2 représentent des individus distincts.

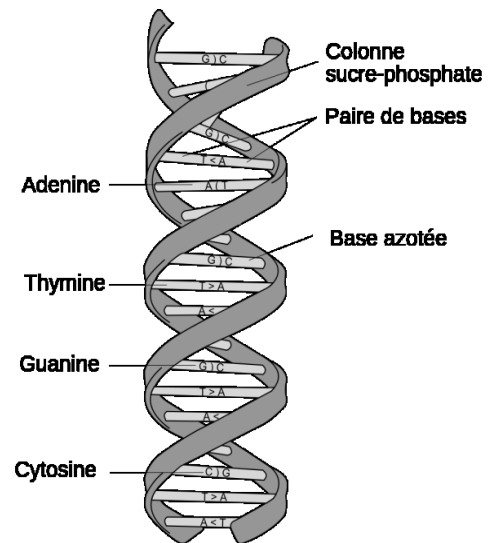


Figure 2: Représentation de l'ADN

Le SMet est un regroupement de plusieurs facteurs de risques cardiométaboliques. Il implique alors un très grand nombre de gènes et la compréhension de son étiologie est très complexe. La génétique du SMet est maintenant le sujet d'un très grand nombre d'études [198]. Les études examinant la génétique du SMet utilisent souvent la méthode par gènes candidats et testent leurs associations avec ses différentes composantes [20]. Par ailleurs, certaines formes d'obésité sont monogéniques, mais elles demeurent excessivement rares et elles n'expliquent pas le problème croissant de l'obésité dans nos sociétés [199, 200]. Avec l'accroissement épidémique de l'obésité dans le monde, la prévalence du SMet augmente de manière variée dans les différentes populations, ce qui pourrait démontrer l'effet de la

génétique et de l'environnement sur le développement de ce désordre [20]. Certains facteurs génétiques prédisposeraient à l'obésité et amplifieraient les effets environnementaux menant au surpoids [201]. Il a d'ailleurs été démontré avec des enfants adoptés que leur corpulence correspondait plus à celle de leurs parents biologiques qu'à celle de leurs parents adoptifs [202]. La susceptibilité comportementale à l'obésité face à un environnement obésogène, comme le niveau de tolérance à l'appétit et de maîtrise de soi, pourrait aussi être influencée par la génétique [203]. Les individus prédisposés génétiquement à l'obésité auraient donc plus de difficulté à perdre du poids que les autres [204]. En étudiant des paires de jumeaux monozygotes et des familles, de nombreuses découvertes ont pu être faites à ce sujet [205, 206]. Il en résulterait qu'environ 65% de la variation de l'obésité serait génétique et héritable [207]. Cependant, il en demeure que la susceptibilité à certains facteurs de risque cardiométabolique varie d'une population à une autre. Par exemple, les Indiens seraient plus susceptibles à la RI et les Afro-Américains ainsi que les Hispaniques au DT2 [208].

Un niveau d'héritabilité a été estimé pour chacune des différentes composantes du SMet. Selon la *Northern Manhattan Family Study*, l'héritabilité pour la circonférence de la taille serait de 46%, 24% pour les niveaux de glucose à jeun, 47% pour les niveaux de TG, 60% pour les niveaux de C-HDL ainsi que 16 et 21% pour les mesures de pression artérielle systolique et diastolique respectivement [209]. Chacune de ces composantes a été associée avec plusieurs gènes et SNPs [42]. Les niveaux de TG pourraient être prédéterminés de manière génétique puisqu'ils ne sont pas élevés chez tous les individus obèses et qu'ils peuvent l'être chez les personnes ne présentant pas de surpoids [42, 210, 211]. Il a d'ailleurs été démontré que le régime alimentaire module les taux de lipides plasmatiques

par l'action de facteurs génétiques [212] et que la réponse lipidique peut varier grandement d'une population à l'autre ainsi que d'un individu à l'autre [213]. En ce sens, des phénotypes particuliers pourraient se révéler suite à un apport alimentaire excessif chronique souvent associé à l'obésité, par l'intermédiaire de gènes demeurant inexprimés en état normal [214]. Des études utilisant la méthode par gènes candidats ont bien démontré que la prédisposition à l'obésité peut bien être modulée par des gènes ayant des fonctions dans la régulation de l'apport énergétique [200].

À tous les jours, chacune des cellules du corps est confrontée à plusieurs agressions dirigées sur son bagage génétique. Celles-ci peuvent être conduites par des agents intracellulaires ou à la suite d'une exposition à certains facteurs toxiques de l'environnement ayant la capacité d'altérer l'ADN [215]. Le stress oxydatif, pouvant être causé par plusieurs facteurs de risque de l'athérosclérose, peut également mener à des dommages à l'ADN [216]. De plus, plusieurs produits dérivant de la peroxydation des lipides sont capables d'interagir avec l'ADN [217]. La hausse de plusieurs constituants du profil lipidique établis comme nocifs d'un individu atteint par le SMet peut donc faire augmenter le stress oxydatif des cellules. Il peut donc en résulter une augmentation du dommage oxydatif de l'ADN et un raccourcissement des télomères [218], un élément considéré comme représentatif de la longévité des cellules [219]. Les télomères sont essentiels à la stabilité génomique et peuvent également être considérés comme des marqueurs de la santé cardiovasculaire et métabolique [220, 221]. Un raccourcissement progressif des télomères a été démontré dans les cellules sanguines des personnes atteintes du SMet, de DT2 et de MCV [222-225]. Il a été observé que le diabète serait un déterminant important de l'endommagement de l'ADN chromosomique [226], probablement dû au stress oxydatif qu'il induit. Ce dernier est fortement associé au développement de plaques d'athérosclérose par le biais de l'instabilité génétique qu'il peut causer [227-231]. Les dommages causés directement à l'ADN en plus du raccourcissement des télomères influencent la santé vasculaire en activant les mécanismes de réparation de l'ADN [232-235]. Un excès de l'utilisation de ces mécanismes peut mener à la sénescence cellulaire et à l'apoptose, contribuant à l'athérosclérose [215]. Cependant, il existerait une variation génétique entre les individus au niveau de leur capacité de métabolisation des éléments toxiques de l'environnement et de réparation de l'ADN suite à une exposition pouvant l'affecter. De cette manière, certains auraient donc un risque plus grand que d'autres vis-à-vis des maladies reliées à une exposition aux divers facteurs environnementaux telles les MCV [236-238]. Le stress oxydatif causant des

dommages à l'ADN pourrait donc être un autre mécanisme potentiel faisant un lien entre le SMet, le DT2, l'inflammation et les MCV [215].

3.1 Les gènes candidats

Depuis environ le milieu des années 90, on étudie les facteurs génétiques susceptibles de participer au développement de l'obésité en utilisant la méthode d'analyse par les gènes candidats [239]. Elle permet de tester indirectement des associations entre des sites de variation dans les gènes et certaines composantes de maladies [240]. Ces gènes peuvent être fonctionnels si un de leurs produits est possiblement relié à la maladie ou positionnels si leur région génique a été observée comme associée à la maladie [240]. Des gènes impliqués dans différents processus tels la signalisation par l'insuline, l'inflammation et la distribution du tissu adipeux jouent des rôles cruciaux dans le développement du SMet et les associations de plusieurs gènes y étant impliqués ont été examinées dans différentes études [198]. Le premier gène découvert comme étant associé à l'obésité est le *FTO* (*fat mass and obesity-associated*) [241-243]. Cependant, il en demeure que certains résultats ressortant de ce type d'étude sont contradictoires [198, 200]. Des études supplémentaires sont donc toujours nécessaires pour valider les résultats.

3.1.1 *NMT1*

NMT1 a été préalablement établi par notre équipe de recherche comme un gène différentiellement exprimé [9] et différentiellement méthylé [10] dans le TAV d'individus obèses SMet+ vs SMet-. Ce gène est localisé sur le chromosome 17 et encode l'enzyme N-myristoyltransferase 1 (*NMT1*). Cette enzyme catalyse la réaction de myristoylation [12], établissant un lien covalent entre l'acide myristique, un acide gras saturé de 14 carbones, et la glycine en position N-terminale d'une protéine [13]. La myristoylation est essentielle pour les interactions protéine-protéine, l'attachement aux membranes et la localisation de certaines protéines [244].

3.1.2 *DGKZ*

Tout comme *NMT1*, *DGKZ* a été observé dans des études préalables comme étant un gène différentiellement exprimé [9] et différentiellement méthylé [10] dans le TAV d'individus obèses SMet+ vs SMet-. Ce gène est situé sur le chromosome 11 et code pour la protéine diacylglycérol kinase (*DGK*)-zeta, une des dix isoformes exprimées chez les mammifères [245]. Elles phosphorylent DAG pour catalyser sa conversion en PA et

inversement [14]. Ces deux molécules sont essentielles dans le métabolisme des lipides et dans plusieurs voies de signalisation, ainsi que dans la constitution de membranes [15].

4. Épigénétique du syndrome métabolique

Il a été pensé qu'un mécanisme indépendant à la séquence polynucléotidique, c'est-à-dire l'épigénétique, pouvait entrer en jeu dans le processus du développement du SMet [246] car l'analyse des paires de jumeaux monozygotes n'étaient pas assez concluantes pour déterminer la génétique comme déterminant exclusif de l'obésité. De plus, l'augmentation de sa prévalence dans le monde a eu lieu trop rapidement pour n'être expliquée que par des changements génétiques, ce qui explique aussi l'implication possible de l'épigénétique [247]. L'étude de l'implication de l'épigénétique dans les maladies a commencé dans les années 1980 avec le cancer [248]. L'intérêt qui y est porté par rapport à d'autres troubles de santé telle l'obésité est maintenant grandissant.

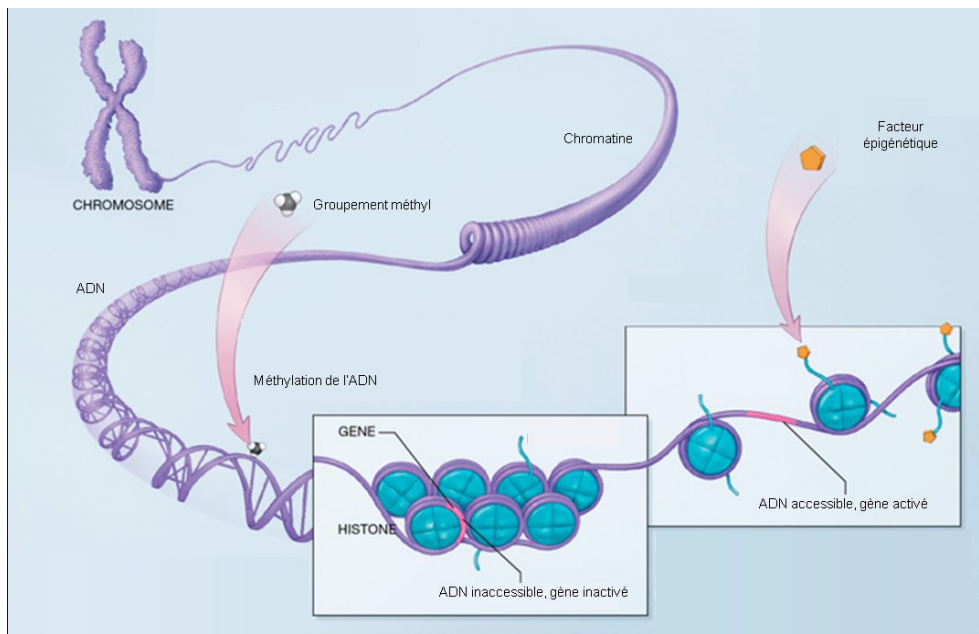


Figure 3: Représentation de mécanismes épigénétiques

L'épigénétique regroupe des mécanismes pouvant moduler l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN (Figure 3) [249]. Elle est influencée par l'environnement, mais également par la génétique [250]. Elle est réversible et transmissible à travers les générations, via la division mitotique [45, 251, 252]. Elle explique les seules différences au niveau de l'ADN entre les jumeaux monozygotes, augmentant au fil du temps [45]. Les

mécanismes épigénétiques sont la méthylation, la modification des histones, le repliement de la chromatine ainsi que l'action régulatrice des ARNs non-codants [253]. La méthylation, c'est-à-dire l'ajout de groupement méthyle sur les cytosines de l'ADN souvent regroupés en dinucléotides cytosine-guanine (CpG) [254], est le plus étudié [255]. Elle joue un rôle essentiel dans l'expression des gènes [256] puisque les séquences riches en dinucléotides CpG sont souvent localisées en amont des séquences codantes, et servent de site promoteur pour initier la transcription des gènes [257]. Des îlots riches en dinucléotides CpG seraient présents selon cet emplacement pour 40 % des gènes et 70 à 80 % des dinucléotides CpG du génome seraient méthylés [258]. Généralement, la méthylation des sites CpG est reliée à la non-transcription [259]. Cependant, cela pourrait varier selon la position de la méthylation dans la séquence du gène [260]. La méthylation de l'ADN est influencée par le poids à la naissance, l'activité physique et l'alimentation [261-263]. Il s'agit d'un mécanisme dynamique tout au long de la vie, débutant même avant la naissance [264]. Une étude a démontré qu'environ 5% des 27 000 sites CpG analysés subissaient des changements de méthylation durant les deux premières années de la vie [265]. En somme, les marques épigénétiques déterminées par la génétique seraient les plus stables, alors que celle déterminées par les facteurs environnementaux seraient plus variables dans le temps et entre les individus [266]. Selon une étude comparant des populations de différentes origines ethniques, deux tiers des sites CpG spécifiques à une population seraient associés au bagage génétique, tandis que le tiers restant serait modulé par d'autres facteurs [267].

Chacune des cellules d'un individu contient la totalité de son code génétique. Pourtant, ce ne sont pas tous les gènes qui sont exprimés dans chacune d'entre elles. Selon le tissu dans lesquelles elles sont contenues, les cellules ont des rôles très distincts et cela sera dicté par les gènes qui vont être exprimés dans celles-ci. Les gènes encodent pour des protéines qui vont mener à la réalisation des fonctions de la cellule [197]. Le changement d'expression des gènes peut être modulé par des facteurs intrinsèques (signaux entre les cellules) ou extrinsèques (l'environnement) [268]. Tel que mentionné précédemment, l'épigénétique régule les changements d'expression de nos gènes. La méthylation de l'ADN est associée à la non-expression des gènes [269, 270]. Les SNPs peuvent avoir un impact sur l'expression des gènes par l'entremise de la méthylation [250, 271]. L'ajout ou le retrait de dinucléotides CpG, causé par un SNP, qui pourront être méthylés dans l'ADN peut affecter l'expression et la fonction d'un gène [271]. Une trop grande méthylation de l'ADN, l'hyperméthylation, a été associée à la maladie chez l'humain [272].

Les modulations épigénétiques ont été précédemment associées au développement de complications métaboliques [273, 274] et la différence interindividuelle au niveau de la susceptibilité à l'obésité en dépendrait [253]. L'altération des mécanismes épigénétiques, les épimutations, a été démontrée grâce à des modèles animaux et humains comme pouvant participer à causer l'obésité [247, 275], et ce surtout au niveau des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides [23]. Ces événements peuvent perturber le bon développement dès le stade embryonnaire, où l'alimentation maternelle est primordiale [276]. Un trop faible apport en aliments donneurs de groupement méthyle peuvent mener à de l'hypométhylation chez l'embryon, ce qui entraîne une surexpression de certains gènes [23, 277, 278]. L'hypométhylation augmente les risques d'obésité [279]. Pour les MCV, autant l'hypométhylation que l'hyperméthylation de l'ADN leur seraient associées [280]. Il en demeure néanmoins que les états d'hypométhylation ou d'hyperméthylation sont réversibles [281]. Vu qu'il s'agit d'une maladie reliée au mode de vie et à l'âge [167], le développement du diabète pourrait également être basé sur des épimutations [282]. L'épigénétique pourrait également jouer un rôle important dans la différenciation des adipocytes, puisque des différences de méthylation de l'ADN ont été observées entre les préadipocytes et leur forme mature [253]. La sécrétion de la leptine serait également influencée par des mécanismes épigénétiques [283].

Les différents nutriments et aliments fonctionnels pourraient affecter notre métabolisme par la voie de modifications épigénétiques [45]. Le profil de méthylation dans le tissu adipeux serait différent entre les personnes répondant bien à un régime alimentaire en vue d'une perte de poids par rapport à ceux y répondant moins bien [246]. Les changements au niveau de l'épigénétique pourraient survenir assez rapidement selon l'exposition à certains facteurs nutritionnels et environnementaux [252]. Par exemple, la méthylation de l'ADN a été observée comme affectée par une diète riche en gras après seulement 5 jours [284]. Plusieurs études d'intervention ont démontré que le profil de méthylation peut réellement être modulé par l'exercice et la diète [262, 285]. Il en était de même pour les chirurgies exécutées en vue d'une perte de poids, qui menaient à un profil de méthylation semblable aux individus de poids santé [286]. La réponse inflammatoire serait également régulée par l'épigénétique [264].

Jusqu'à maintenant, les observations ne sont pas assez concluantes pour établir une relation claire entre la méthylation dite globale de l'ADN et l'obésité, comparativement à la situation lors d'un cancer où la méthylation globale y est reliée [255]. C'est pourquoi on

utilise une approche par association de loci ou de gènes candidats dans le cas de l'obésité. La méthylation est comme énoncé ci-haut le mécanisme épigénétique le plus étudié, alors que les modifications d'histones et les ARNs non-codants sont peu analysées [255]. Pourtant, les modifications d'histones pourraient influencer la méthylation de l'ADN et ont même été associées à l'adipogenèse [287]. Elles devraient donc être considérées avec plus d'intérêt.

Le sang pourrait être utilisé pour observer différents profils de méthylation vu sa composition comptant plusieurs types cellulaires [288, 289]. Toutefois, au fil du temps, l'environnement induit des changements à ce niveau qui sont spécifiques à chacun des tissus et les changements épigénétiques ne seront plus reflétés par le sang [255]. Le tissu adipeux demeure le tissu où il est le plus pertinent d'étudier le profil de méthylation dans la situation de l'obésité [255]. La stabilité dans le temps ainsi que la variabilité entre les individus sont somme toute des critères importants lorsqu'on étudie la méthylation comme biomarqueur du risque face à une certaine maladie [255].

Tel que mentionné précédemment, l'épigénétique fait le pont entre l'environnement entourant un individu et sa génétique. L'environnement propice est donc essentiel à l'expression de certains phénotypes malgré une prédisposition génétique. Dans un environnement obésogène, les personnes ayant un haut risque génétique de développer de l'obésité seront donc plus susceptibles de gagner plus de poids que celles ayant un faible risque [200].

5. Objectifs

5.1 Objectif général

Évaluer les associations entre les SNPs des deux gènes candidats *NMT1* et *DGKZ* avec les complications métaboliques chez les individus souffrant d'obésité sévère, ainsi qu'avec les niveaux de méthylation génique pour savoir s'il s'agit du mécanisme intermédiaire reliant la variabilité à l'expression génique.

5.2 Objectifs spécifiques

L'objectif général peut se diviser en trois objectifs spécifiques.

1. D'abord, tester les associations des SNPs de chacun des deux gènes avec les différentes composantes du SMet (lipides sanguins, glucose à jeun, CRP et tension artérielle) dans la cohorte d'individus avec obésité sévère.
2. Ensuite, tester l'association entre les SNPs ayant un effet significatif sur les composantes du SMet à l'étape précédente et le niveau de méthylation des sites CpG.
3. Puis, mesurer les corrélations entre les sites CpG de méthylation significatifs à l'étape précédente et le niveau d'expression génique des deux gènes candidats.

6. Hypothèses

6.1 Hypothèse générale

Les variations génétiques et la méthylation des sites CpG des gènes candidats *NMT1* et *DGKZ* sont impliquées dans le développement des complications métaboliques reliées à l'obésité.

6.2 Hypothèses spécifiques

Les différents SNPs des deux gènes candidats sont associés aux complications métaboliques de l'obésité.

Le niveau de méthylation des sites CpG est associé aux différents SNPs des deux gènes candidats.

Le niveau de méthylation dans le TAV est relié à l'expression génique de *NMT1* et *DGKZ*.

7. Méthodologie

7.1 Sélection des sujets

Pour cette étude, les sujets recrutés devaient être sévèrement obèses ($IMC \geq 35$ kg/m²), être d'origine canadienne-française et subir une chirurgie bariatrique à l'Institut de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ) (Québec, Québec, Canada). Une cohorte de 1752 individus obèses incluant 545 hommes et 1207 femmes a été sélectionnée pour les analyses des articles du présent mémoire. Les critères du *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII) ont été utilisés pour déterminer la présence du SMet chez les patients [16]. Avant la chirurgie, la masse corporelle, la taille, le tour de taille, le profil lipidique plasmatique et la pression artérielle ont été mesurés en utilisant les procédures standards [290]. L'IMC a été calculé en divisant le poids en kilogrammes par la taille en mètres carrés. La concentration plasmatique de la CRP a été mesurée avec un CRP-hs immunologique employant un anticorps monoclonal recouvert de particules de polystyrène. Les tissus humains, prélevés lors de la chirurgie, ont été obtenus à partir de la biobanque de l'IUCPQ conformément aux modalités institutionnelles. Tous les sujets inclus dans cette étude ont fourni un formulaire de consentement approuvé par le comité d'éthique.

7.2 Sélection des gènes

À partir d'études précédentes, les deux gènes *NMT1* et *DGKZ* ont été déterminés comme différentiellement exprimés et méthylés dans le TAV des individus obèses SMet+ par rapport aux individus SMet- [9, 10]. Ils ont par la suite été considérés comme plus prometteurs selon trois critères : 1-) la différence d'expression supérieure à 2; 2-) plausibilité biologique selon le rôle du gène; 3-) validité des résultats (expression validée par qRT-PCR). Ils ont ensuite été choisis pour ce projet puisqu'ils jouaient des rôles similaires, c'est-à-dire qu'ils sont impliqués dans le métabolisme des lipides.

7.3 Sélection des SNPs et génotypage

À l'intérieur de la séquence de *NMT1* et *DGKZ*, douze et cinq SNPs ont été sélectionnés respectivement en utilisant la procédure Tagger du logiciel Haploview (pairwise tagging, $R^2 \geq 0.80$) en utilisant une fréquence de l'allèle mineur (MAF) de 5%. La variabilité génétique des polymorphismes communs (MAF $\geq 1\%$) a de cette manière été couverte à 100%. Pour le génotypage des SNPs sélectionnés des deux gènes candidats, l'ADN a été

extrait à partir de la couche leucocytaire du sang en utilisant le kit *GenElute Blood Genomic DNA* (Sigma, St-Louis, MO). Les SNPs ont été génotypés à l'aide du logiciel *QuantStudio™ 12K Flex OpenArray® AccuFill™ system* (Applied Biosystems) et analysés avec *TaqMan Genotyper v1.3* (Life Technologies).

7.4 Analyse de la méthylation de l'ADN

L'analyse de la méthylation de l'ADN a été réalisée à partir d'un sous-groupe de 32 individus sévèrement obèses, provenant de la cohorte principale [10]. Ce sous-groupe incluait le sous-groupe de 14 individus (SMet+, N=7 ; SMet-, N=7) utilisé pour l'analyse de l'expression génique et les 18 individus supplémentaires (SMet+, N=9 ; SMet-, N=9) ont été sélectionnés pour représenter les extrêmes du spectre de diagnostic selon les critères du SMet. Des échantillons de 200 mg de TAV étaient utilisés pour l'extraction d'ADN génomique à l'aide du kit *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). La conversion au bisulfite, réalisée avec 1 µg d'ADN, ainsi que l'analyse quantitative de la méthylation ont été exécutées à l'Université McGill et au Centre d'innovation Génome Québec (Montréal, Canada). La micropuce *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina, San Diego, CA) couvrant plus de 485000 sites de méthylation à une résolution d'un nucléotide simple a été utilisée en suivant les instructions du fabricant. La version 2011.1 du logiciel *GenomeStudio* (Illumina Inc.) et les modules de méthylation ont été utilisés pour visualiser et analyser les données de méthylation. Les niveaux de méthylation (valeurs beta ; β) ont été estimés en calculant le ratio de l'intensité du signal de l'allèle méthylé sur la somme de l'intensité du signal des allèles méthylés et non-méthylés (valeur $\beta = C/(T+C)$). Le contrôle interne de la correction des paires de sondes a été appliqué pour la correction des données. Le module de méthylation du logiciel *GenomeStudio* a été utilisé pour extraire les sites CpG localisés dans les loci et les régions promotrices des gènes, menant à une analyse de 26 sites CpG pour *NMT1* et 66 pour *DGKZ*. *NMT1* a été établi comme différentiellement méthylé compte tenu du site CpG cg00693003, tandis qu'il s'agissait du site cg12856521 pour *DGKZ*.

7.5 Expression génique

L'analyse de l'expression génique a été réalisée avec un sous-groupe de 14 individus (SMet+, N=7 ; SMet -, N=7) ne prenant aucune médication pour traiter les composantes du SMet. Les individus ont été regroupés en paires les plus semblables possibles selon l'âge, l'IMC et le tabagisme. Le protocole menant à l'identification de *NMT1* et *DGKZ* comme

différentiellement exprimé dans le TAV des individus obèses provient d'une étude précédente [9]. En résumé, l'ARN était extrait du TAV en utilisant le kit *Qiagen RNeasy Lipid Tissue Minikit & Qiagen RNeasy MinElute Cleanup Kit* (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Les analyses des données des micropuces étaient ensuite réalisées avec le logiciel *Microarray Analysis Suite 5.0* (MAS5 ; Affymetrix) et les résultats étaient vérifiés par RT-PCR.

7.6 Analyses statistiques

D'abord, les différences entre les marqueurs métaboliques chez les individus des groupes SMet+ et SMet- ont été testées. L'équilibre de Hardy-Weinberg (EHW) a été vérifié pour chaque SNP des deux gènes. Pour ceux ayant une fréquence génotypique de l'homozygote rare plus petit que 5% (*NMT1*, 6 SNPs: rs41484746, rs8066395, rs10491142, rs2239921, rs2239922 et rs2269746; *DGKZ*, 2 SNPs : rs3740976 et rs3809047), ces homozygotes ont été combinés aux hétérozygotes pour les analyses statistiques. La procédure GLM a été utilisée pour tester les associations entre les SNPs et les composantes du SMet. Des ajustements pour l'âge, le sexe, l'IMC et la médication pour traiter les composantes du SMet étaient appliqués lorsque nécessaire. Lorsque l'effet d'un SNP était significatif, toutes les comparaisons entre les génotypes étaient effectuées en utilisant la méthode des moindres carrés et le test *t* de Student. Les coefficients de corrélations de Pearson ont servi à déterminer la relation entre la méthylation, l'expression génique et les composantes du SMet. Les valeurs *P* ont été calculées pour toutes les associations et ont été considérées comme statistiquement significatives si la valeur *P* était plus petite que 0.05. Le logiciel SAS version 9.3 a été utilisé pour les analyses statistiques.

Chapitre 2 : L'impact des polymorphismes du gène *NMT1* sur les composantes du syndrome métabolique chez les patients avec obésité sévère.

Impact of NMT1 Gene Polymorphisms on Features of the Metabolic Syndrome among Severely Obese Patients.

Cet article a été publié en novembre 2015 dans le journal *Obesity Research - Open Journal [1]*. J'y ai réalisé les analyses statistiques et rédigé le manuscrit. Les résultats de cette étude ont été présentés sous forme de présentation par affiche au congrès de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM) en février 2016 au Mont Orford, Québec.

Résumé de l'article

Introduction : *NMT1* a été établi comme surexprimé et hyperméthylé dans le TAV des personnes obèses SMet+ par rapport aux SMet-.

Objectifs: Vérifier les associations entre les SNPs de *NMT1* et les composantes du SMet.

Méthodes: Cette étude inclut 1752 participants subissant une chirurgie bariatrique. Les associations entre les SNPs de *NMT1* et les composantes du SMet étaient vérifiées. Ensuite, l'implication de la méthylation entre la variation et l'expression génique était testée.

Résultats: Le SNP rs2239921 est associé à la tension artérielle. Le SNP rs2239923 est associé au C-HDL tandis que le SNP rs2269746 l'est avec le C-LDL et le cholestérol total. La CRP est associée aux SNPs rs1005136, rs8066395 et rs2157840. Ces six SNPs influençaient la méthylation de six sites CpG de *NMT1*. L'un d'eux, cg10755730, était corrélé à l'expression du gène.

Conclusion: Ces résultats suggèrent que des SNPs de *NMT1* sont associés avec une altération de certains phénotypes chez les patients avec obésité sévère.

Impact of *NMT1* Gene Polymorphisms on Features of the Metabolic Syndrome among Severely Obese Patients.

Stéphanie Bégin^{1,2}, Frédéric Guénard^{1,2}, André Tchernof^{2,3}, Yves Deshaies^{3,4}, Louis Pérusse^{1,5}, Simon Biron^{3,6}, Odette Lescelleur^{3,6}, Laurent Biertho^{3,6}, Simon Marceau^{3,6} and Marie-Claude Vohl^{1,2}*

1. Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, QC, Canada
2. School of Nutrition, Laval University, Quebec, QC, Canada
3. Quebec Heart and Lung Institute, Quebec, QC, Canada
4. Department of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada
5. Department of Kinesiology, Laval University, Quebec, QC, Canada
6. Department of Surgery, Laval University, Quebec, QC, Canada

* Corresponding author:

Marie-Claude Vohl Ph.D.

Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF)

2440 Hochelaga Blvd.

Quebec, Canada

G1V 0A6

Tel.: (418) 656-2131 ext. 4676, Fax: (418) 656-5877

Email: marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

ABSTRACT

Introduction: N-myristoyltransferase is implicated in myristoylation, required for biological activities of several proteins. Its gene *NMT1* has been found to be overexpressed and hypermethylated in visceral adipose tissue (VAT) of severely obese individuals with metabolic syndrome (MetS+) versus without (MetS-). **Objective:** The aim of this study was to verify the associations between *NMT1* gene polymorphisms (SNPs) and metabolic complications among obese subjects. **Methods:** Associations between SNPs and determinants of MetS were tested with 1752 obese participants undergoing a bariatric surgery. The effect of selected SNPs on methylation, and correlation with expression levels of *NMT1* were verified in subgroups. **Results:** Rs2239921 was significantly associated with systolic ($p=0.03$) and diastolic ($p<0.0001$) blood pressures. Rs2239923 was associated with plasma HDL-Cholesterol (HDL-C) levels ($p=0.05$), while rs2269746 was associated with LDL-C ($p=0.006$) and total-C levels ($p=0.004$). Rs1005136 ($p=0.03$), rs8066395 ($p=0.03$) or rs2157840 ($p=0.04$) were associated with plasma concentrations of C-reactive protein. Phenotype-associated SNPs were associated with *NMT1* methylation levels of six CpG sites. *NMT1* methylation levels of one CpG site, cg10755730, correlated with gene expression levels ($r=0.57$; $p=0.04$). **Conclusion:** These results suggest that the presence of *NMT1* SNPs is associated with altered plasma lipid levels as well as with increased inflammation markers and blood pressure among severely obese patients.

Introduction

Obesity is a major health problem worldwide due to the imbalance created by physical inactivity and the abundance of food, which are influenced by intrinsic and extrinsic factors (1). This condition brings about significantly increased risk of cardiovascular diseases (CVD) and type 2 diabetes (T2D) (2) through a constellation of risk factors characterizing the metabolic syndrome (MetS) (3). However, nearly 20% of severely obese individuals remain exempt of MetS (3). This could be partly explained by genetic factors and epigenetic modifications. Epigenetics modulate gene expression and can also be involved in the process leading to increased comorbidities in certain obese individuals, as they are both transmissible and influenced by the environment (4). It encompasses strong mechanisms that regulate gene expression without affecting the DNA sequence (5). Also, epigenetic marks, such as CpG dinucleotides, are more frequent in promoter regions and first exons of specific genes (6), consistent with a major role for methylation in the regulation of gene expression. We have previously shown that methylation levels are associated with MetS (7) and its features (8).

The *NMT1* gene, located on chromosome 17, encodes the enzyme N-myristoyltransferase 1 (NMT1). It catalyzes the irreversible reaction of myristoylation (9), which makes a specific covalent linkage between myristic acid, a 14-carbon saturated fatty acid, and the NH₂-terminal glycine of a protein (10). For many proteins, myristoylation is essential for stability and functions, such as protein-protein interactions, membrane attachment and cellular localization (11). Myristoylation may also be involved in the regulation of gene transcription through modification of DNA-binding proteins (11). *NMT1* has not been previously associated with MetS, but as it induces important protein modifications (12), and is largely linked with disease state (13), it may potentially be related to obesity comorbidities. Previous work by our team observed *NMT1* as being differentially expressed and methylated between subjects with MetS (Mets+) and without MetS (MetS-) (14, 15). The aim of the current study was thus to test for specific associations between *NMT1* genetic variations and metabolic complications among severely obese patients. Afterwards, the association between the phenotype-associated SNPs and methylation sites, as well as between these sites and expression levels, were tested to further understand the potential underlying mechanisms relating *NMT1* to obesity-related complications. We therefore hypothesize that genetic variations/SNPs in *NMT1* are associated with features of MetS and that *NMT1* gene methylation levels are associated with obesity-related metabolic complications, based on the role of methylation in the regulation of gene expression (16).

Material and Methods

Subjects Selection

A total of 1752 severely obese men (N=545) and women (N=1207) were recruited among patients undergoing a bariatric surgery (biliopancreatic diversion with duodenal switch) since June 2000 at the Québec Heart and Lung Institute (Québec City, Québec, Canada). The surgical protocol has been described elsewhere (17). Body weight, height, waist girth and resting systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured before the surgery using standardized procedures. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. C-reactive protein (CRP) concentrations in plasma were measured with an hs-CRP immunoassay using a monoclonal antibody coated with polystyrene particles (18). The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) diagnosis criteria (19) were used to determine the presence of MetS. All subjects included in the study provided a written informed consent and Université Laval ethics committee approved the study. Tissue specimens were obtained from the Biobank of the *Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec* according to institutionally-approved management modalities.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from the blood buffy coat using the GenElute Blood Genomic DNA kit (Sigma, St Louis, MO). Based on differential expression and methylation of the *NMT1* gene in a previous dataset (14), 11 tag single nucleotide polymorphisms (tSNPs) spanning promoter (2 kb), coding and intronic regions of the *NMT1* gene in addition to the 3' gene region (2 kb) were selected for analysis using the Tagger selection algorithm of the Haploview software (pairwise tagging, $R^2 \geq 0.80$) (20). This strategy allowed covering 100% of the genetic variability of the common polymorphisms ($MAF \geq 1\%$) at the *NMT1* locus in the Caucasian population (CEU HapMap). In addition, rs2157840 SNP was included in this study due to its close localization to the cg00693004 CpG site previously found to be differentially methylated between MetS+ and MetS- subjects [17]. We thus ended up with a set of 12 SNPs analyzed in the current study. SNPs were genotyped, using the QuantStudio™ 12K Flex OpenArray® AccuFill™ system (Applied Biosystems) and analyzed with TaqMan Genotyper v1.3 (Life Technologies).

DNA methylation analysis

A second subgroup of 32 obese individuals chosen among the larger group was used for DNA methylation analysis, including the 14 subjects (MetS+, N=7; MetS-, N=7) selected for gene expression profiling (14). The 18 obese individuals (MetS+, N=9; MetS-, N=9) added to the 14 initially studied (15) were selected to fulfill initial selection criteria (14) and to represent extremes of the MetS diagnosis criteria spectrum. Genomic DNA extraction was achieved from 200 mg of visceral adipose tissue (VAT) using the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). Bisulfite conversion was conducted on 1 µg of DNA, and quantitative DNA methylation analysis was carried out at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Canada). Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) were processed according to the manufacturer's instructions. The BeadChips interrogate more than 485000 methylation sites at single-nucleotide resolution. Methylation data were visualized and analyzed with the GenomeStudio software version 2011.1 (Illumina Inc.) and the methylation module. Methylation levels (beta values; β) were estimated as the ratio of signal intensity of the methylated alleles to the sum of methylated and unmethylated intensity signals of the alleles (β value = $C/(T+C)$). We applied internal control probe pairs for data correction (background subtraction and normalization). CpG sites located within the *NMT1* locus and promoter region were extracted using the GenomeStudio Methylation Module, thus leading to a total of 26 CpG sites analyzed in this study. *NMT1* was identified as differentially methylated [(Diffscore = 341.86) based on the differentially methylated CpG site cg00693004 (chr17:43151433, according to genome build 37).

Gene expression

Expression data for the *NMT1* gene presented here were retrieved from a previous study aimed at the identification of differentially methylated genes between MetS+ and MetS- severely obese men. The protocol leading to the identification of *NMT1* as being differentially expressed between severely obese (BMI > 40 kg/m²) MetS+ and MetS- men has been previously described (14). Briefly, 14 severely obese men with and without MetS, who did not take any medication to treat MetS components, were matched as closely as possible for age, BMI and smoking status. Characteristics of individuals sorted by MetS groups are available elsewhere (14). Even if it is not listed in the tables due to the large number of genes discovered, this investigation led to the determination of *NMT1* gene as being overexpressed within VAT of the MetS+ versus MetS- subsets (1.35-fold; p=0.04).

Statistical analysis

At first, phenotypic differences between the MetS+ and MetS- groups were tested for the entire cohort. Gene expression microarray analysis was conducted using unpaired Student's t-test, and differentially expressed genes were compared between MetS+ and MetS- groups. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was verified. For SNPs showing a frequency of rare homozygotes below 5%, homozygotes for the rare allele were merged to heterozygotes for statistical analysis (6 SNPs: rs41484746, rs8066395, rs10491142, rs2239921, rs2239922 and rs2269746). The GLM procedure was used to test associations between SNPs and MetS components, with adjustments for age, sex, BMI and medication to treat MetS features when appropriate. When a significant SNP effect was identified, all pairwise comparisons among genotype groups were performed using least square means and Student's t-tests. Pearson correlation coefficients were computed to assess the relationship between methylation, expression and MetS components. P-values were calculated for all associations and were considered to be statistically significant if the P-value was less than 0.05. Statistical analyses were performed with SAS software version 9.3. Phenotypic data are presented as mean \pm SD.

Results

Cohort Description

From the study sample of 1752 severely obese subjects, 1745 patients were classified as being MetS+ (n=1428) or MetS- (n=317 or 20.19%). All characteristics shown in Table 1 were significantly different between MetS+ and MetS- groups, except BMI and plasma CRP levels. The MetS+ group had a higher mean age and showed significantly higher values for waist girth, fasting glucose, triglycerides (TG), total-C/HDL-C ratio, SBP and DBP. The MetS- group showed significantly higher plasma concentrations for total-C, LDL-C and HDL-C.

Identification of *NMT1* SNPs

Regarding the 12 SNPs, 8 were intronic and 4 were exonic, 2 of them being in the 3' untranslated region (exon 12) (Table 2). Exonic SNPs rs2239922 and rs2239923 were synonymous variations. These 12 tSNPs were further genotyped in the whole cohort of 1752 participants. Genotype distribution and HWE p-values are also shown in Table 2.

Association of *NMT1* SNPs with features of the MetS

Associations between tSNPs, and plasma fasting glucose, lipid, CRP levels as well as blood pressure, taking into account the confounding effects of age, sex, BMI and medication, were tested. Significant associations were observed for rs2239921, rs2239923, rs2269746, rs8066395, rs2157840 and rs1005136 (Table 3). Carriers of the rare allele for rs2239921 showed lower systolic ($p=0.03$) and diastolic ($p<0.0001$) blood pressures than wild-type homozygotes. Rare homozygotes for rs2239923 displayed elevated HDL-C levels compared to the other genotype groups ($p=0.05$), while carriers of the wild-type genotype for rs2269746 demonstrated higher levels of LDL ($p=0.006$) and total-C ($p=0.004$) than carriers of the rare allele. Homozygotes of the wild-type allele for rs1005136, rs8066395 and rs2157840 displayed elevated plasma CRP levels ($p=0.03$, $p=0.03$ and $p=0.04$ respectively). Two trends were also found, the first for association between rs12449933 with elevated plasma TG concentrations ($p=0.08$; 2.15 ± 1.58 vs. 1.82 ± 1.08 vs. 1.78 ± 0.94 mmol/L) in rare homozygotes, and the second in carriers of the wild-type genotype for rs41484746 with higher BMI ($p=0.06$; 51.8 ± 8.7 vs. 50.8 ± 8.2 kg/m²) and waist girth ($p=0.06$; 140.8 ± 17.9 vs. 139.1 ± 16.8) than carriers of the rare allele.

Gene methylation and expression analysis

With the perspective of trying to better understand the mechanism underlying the association between *NMT1*'s SNPs and CVD risk factors, we investigated gene methylation and expression levels. Between genotype group differences in methylation and expression levels were tested only for CVD risk factor-associated SNPs (rs2239921, rs2239923, rs2269746, rs8066395, rs2157840 and rs1005136). Methylation levels were available for 26 CpG sites distributed within or near the gene; the precise locations are presented in Table 4. Six CpG sites were significantly associated with phenotype-associated SNPs. There was an association between methylation and gene expression levels only for cg10755730 ($r=0.574$; $p=0.04$; Table 5).

Discussion

Only a few studies on *NMT1* are related to obesity or T2D (21) with most studies related to cancer (22). The tyrosine-kinases c-Src family, which includes important oncogenesis-related molecules (23), was identified among its main substrates (24). For this reason, it represents a therapeutic target for cancer treatment (22), and has drawn a lot of attention recently. Moreover, known *NMT1* substrates are kinases, phosphatases and G-proteins (21), involved in numerous signal-transduction cascades (10). *NMT1* is thus implicated in several metabolic processes, from cell development to apoptosis (25). In a transcriptomic experiment, we observed that the *NMT1* gene was overexpressed in VAT of MetS+ obese patients, so it was compelling to examine the associations between variations in this gene and metabolic complications of obesity. For instance, the reaction of myristoylation involves myristic acid, a saturated fatty acid (10), which has been associated with the Western high-fat diet and related disease conditions (26). Additionally, lipid-modified proteins may be integrated in the initiation of atherosclerosis (27). A link between variants of this gene and obesity-related comorbidities is of interest. Moreover, an analysis of sequences coding for novel proteins potentially associated with MetS showed that they had numerous myristoylation sites (28), suggesting that this type of modification can affect their activity. In this study, we reveal associations between genetic variations of the *NMT1* gene and components of MetS.

Considering that *NMT1* was found to be differentially expressed and methylated in VAT of MetS+ vs MetS- obese men, associations of *NMT1* SNPs with obesity-related metabolic complications (BP, CRP, glucose and lipid levels) were tested. Six gene polymorphisms of *NMT1* (rs2239921, rs2239923, rs2269746, rs8066395, rs2157840 and rs1005136) were associated with obesity-related phenotypes. Our results suggest that *NMT1* is affecting inflammatory markers and blood pressure, as well as the plasma lipid profile. Thus, it contributes to the inter-individual variability observed in metabolic complications among obese patients. Although, no other study has considered *NMT1* as a candidate gene for the MetS. The involvement of *NMT1* in a genetic syndrome has, however, been demonstrated through the example of the N-myristoylated mutant form of the protein SHOC2 leading to the Noonan-like syndrome (29). Whereas the wild-type protein is not myristoylated, a missense mutation in the SHOC2 gene results into its myristoylation, leading to the disorder. As proposed by Martin and coll. (25), this suggests that it is possible for other proteins that are not normally myristoylated to undergo this modification under certain circumstances and lead to damaging health conditions. Conversely, myristoylation

can induce protection, such as in the case of cardiac ischemia-reperfusion injury where this protein modification protects against oxidation (30).

To our knowledge, the present study is the first to present data suggesting a potential role for *NMT1* in lipoprotein and cholesterol metabolism, and it is particularly relevant as plasma lipid alterations are major elements of obesity and associated health risk factors (31). Gene methylation and expression levels were thus examined to better understand the link between *NMT1* gene SNPs and MetS risk factors. Also, SNPs may influence gene methylation and expression levels (32). Further analyses were conducted with the six phenotype-associated SNPs and all of them were found to be significantly associated with at least one of the 26 CpG sites selected. This result suggests that *NMT1* SNPs affect gene methylation levels. Among the six significant CpG sites, only one (cg10755730) was significantly correlated with *NMT1* gene expression. The SNP rs2239923 was significantly associated with this methylation site ($p=0.03$), so it may be associated with *NMT1* gene expression. The link of *NMT1* phenotype-associated SNPs with gene methylation levels of CpG sites indicates a potential mechanism affecting gene expression and protein activity. Additional studies are needed to confirm the present findings and to better understand how *NMT1* SNPs, gene methylation and expression levels are linked to obesity and MetS.

Besides the absence of studies reporting associations between *NMT1* gene SNPs and plasma lipid levels, a possible link between *NMT1* and insulin has been put forward (21, 33, 34). It is thus tempting to speculate that a possible mechanism relating *NMT1* to obesity and MetS might involve insulin. First, the known substrates of *NMT1* and insulin are indicated to be similar (21). King et al. has also suggested that *NMT1* is regulated by insulin, because the protein activity was observed to be inversely proportional to insulin levels in plasma (21, 34). As well, it has been reported that the insulin receptor can be myristoylated (33). Afterwards, the observation that *NMT1* is overexpressed in MetS+ vs MetS- obese subjects is in agreement with a possible insulin resistance associated with MetS. The demand of myristoylation by myristoylated proteins can modulate gene expression, like it is demonstrated in tumorigenesis (35). Taken together, these observations would suggest that the differential expression of the *NMT1* gene between MetS+ and MetS- groups might be coming from an altered insulin pathway/function, and affect any of its constituents that need to be myristoylated. Indeed, insulin is considered to play a key role in the pathogenesis of the MetS (36), even if it is not fully understood. Insulin resistant adipose tissue with limited

expandability and lipid storage capacity eventually leads to systemic insulin resistance, involving of course other important sites of glucose uptake such as skeletal muscle, due to excessive postprandial non-esterified fatty acid spillover to non-adipose tissues and inflammatory mechanisms (37). Hyperglycemia and dyslipidemia eventually emerge as major consequences of these alterations (37). Similar mechanisms may also partly apply to hypertension which is related to obesity and insulin resistance (38).

The present results support the potential role of *NMT1* in MetS. Nevertheless, this study is based on associations that need to take into account some potential limitations. First, gene methylation and expression in VAT were measured on a relatively small number of subjects. However, these analyses were only preliminary to find a potential mechanism relating gene variations to their associations with phenotypes. Additionally, for gene methylation and expression, VAT samples in their entirety were used for analyses, meaning that all cell types such as endothelial cells, fibroblasts and macrophages were included in addition to adipose cells. Between subjects differences in tissue composition could affect the results. Measurements on isolated cell fractions in future studies are needed. The results presented here were obtained by testing samples from severely obese individuals. This condition is known to modulate systemic inflammation (39) which may also have altered the effects of *NMT1* SNPs.

Conclusion

Knowing that *NMT1* is overexpressed and hypermethylated in VAT of MetS+ compared to MetS- obese patients, the current study reveals the associations between SNPs within this gene and obesity-related metabolic complications. Specifically, SNPs of *NMT1* are associated with an altered lipid profile as well as with increased inflammatory marker levels and blood pressures. Additionally, the data related to gene methylation and expression levels suggest potential mechanisms linking *NMT1* gene variations to MetS risk factors.

Acknowledgements

We acknowledge the inestimable collaboration of surgeons Frédéric-Simon Hould, Stéfane Lebel and Picard Marceau from the Québec Heart and Lung Institute bariatric surgery team, who have also sampled adipose tissue for this project and contributed to the organization of the clinical setup needed to perform our studies. We express our gratitude to Christine Racine and Caroline Gagnon from the Québec Heart and Lung Institute biobank. We also thank Catherine Raymond, Alain Houde for sample management and technical assistance. M.C.V. is Canada Research Chair in Genomics Applied to Nutrition and Health recipient. This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests. AT receives research funding from Johnson & Johnson Medical Companies for studies unrelated to the present publication.

Authors' Contributions

SBégin wrote the article; SBégin and FG completed the statistical analyses; MCV, AT, YD and LP established study design; SBiron, OL, LB and SM recruited patients, collected clinical data and samples; SBégin and MCV have principal liability for final content.

All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Albuquerque D, Stice E, Rodriguez-Lopez R, et al. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Molecular genetics and genomics* : MGG. 2015.
2. Bluher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013; 27: 163-77.
3. Hamer M, Stamatakis E. Metabolically healthy obesity and risk of all-cause and cardiovascular disease mortality. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012; 97: 2482-8.
4. Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, et al. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Molecular aspects of medicine*. 2013; 34: 782-812.
5. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007; 447: 396-8.
6. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, et al. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 1992; 13: 1095-107.
7. Turcot V, Tchernof A, Deshaies Y, et al. LINE-1 methylation in visceral adipose tissue of severely obese individuals is associated with metabolic syndrome status and related phenotypes. *Clinical epigenetics*. 2012; 4: 10.
8. Turcot V, Bouchard L, Faucher G, et al. DPP4 gene DNA methylation in the omentum is associated with its gene expression and plasma lipid profile in severe obesity. *Obesity*. 2011; 19: 388-95.
9. Towler DA, Adams SP, Eubanks SR, et al. Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84: 2708-12.
10. Johnson DR, Bhatnagar RS, Knoll LJ, et al. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annual review of biochemistry*. 1994; 63: 869-914.
11. Kamata N, Jotte RM, Holt JT. Myristylation alters DNA-binding activity and transactivation of FBR (gag-fos) protein. *Molecular and cellular biology*. 1991; 11: 765-72.
12. Hannoush RN. Synthetic protein lipidation. *Current opinion in chemical biology*. 2015; 28: 39-46.
13. Thinon E, Serwa RA, Broncel M, et al. Global profiling of co- and post-translationally N-myristoylated proteomes in human cells. *Nature communications*. 2014; 5: 4919.
14. Bouchard L, Tchernof A, Deshaies Y, et al. ZFP36: a promising candidate gene for obesity-related metabolic complications identified by converging genomics. *Obesity surgery*. 2007; 17: 372-82.
15. Guenard F, Tchernof A, Deshaies Y, et al. Differential methylation in visceral adipose tissue of obese men discordant for metabolic disturbances. *Physiol Genomics*. 2014; 46: 216-22.
16. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *Journal of dental research*. 2009; 88: 400-8.
17. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res*. 2004; 12: 1217-22.
18. Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2006; 97: 3A-11A.
19. Expert Panel on Detection EaToHBCA. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol Adults (Adult Treatment Panel III). *The Journal of the American Medical Association*, 2001.
20. Bakker MI, May L, Hatta M, et al. Genetic, household and spatial clustering of leprosy on an island in Indonesia: a population-based study. *BMC Med Genet*. 2005; 6: 40.

21. King MJ, Pugazhenth S, Khandelwal RL, et al. Membrane-associated N-myristoyltransferase activity is reduced in obese (fa/fa) Zucker rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993; 196: 665-70.
22. Felsted RL, Glover CJ, Hartman K. Protein N-myristoylation as a chemotherapeutic target for cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87: 1571-3.
23. Dehm SM, Bonham K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol*. 2004; 82: 263-74.
24. Buss JE, Kamps MP, Gould K, et al. The absence of myristic acid decreases membrane binding of p60src but does not affect tyrosine protein kinase activity. *Journal of virology*. 1986; 58: 468-74.
25. Martin DD, Beauchamp E, Berthiaume LG. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*. 2011; 93: 18-31.
26. Burdock GA, Carabin IG. Safety assessment of myristic acid as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45: 517-29.
27. Ferri N, Paoletti R, Corsini A. Lipid-modified proteins as biomarkers for cardiovascular disease: a review. *Biomarkers*. 2005; 10: 219-37.
28. Cui X, Chen J, Fang D. Bioinformatic analyses and an expression study of a novel gene associated with metabolic syndrome. *Biosci Trends*. 2010; 4: 165-9.
29. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nature genetics*. 2009; 41: 1022-6.
30. Zhao H, Sun J, Deschamps AM, et al. Myristoylated methionine sulfoxide reductase A protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301: H1513-8.
31. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013; 5: 1218-40.
32. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, et al. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome biology*. 2011; 12: R10.
33. Hedo JA, Collier E, Watkinson A. Myristyl and palmityl acylation of the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1987; 262: 954-7.
34. Sharma RK. Potential role of N-myristoyltransferase in pathogenic conditions. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004; 82: 849-59.
35. Shrivastav A, Sharma AR, Bajaj G, et al. Elevated N-myristoyltransferase activity and expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2007; 18: 93-7.
36. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120: 1640-5.
37. Stancakova A, Laakso M. Genetics of metabolic syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2014; 15: 243-52.
38. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77: 511-23.
39. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444: 860-7.

Table 1: Subjects' characteristics.

	All	MetS+	MetS-	<i>P</i> value
Number of Subjects (% male)	1752 (31.1)	1428 (33.61)	317 (20.19)	—
Age (years)	43.0 ± 10.6	44.0 ± 10.6	38.7 ± 9.8	<0.0001
BMI (kg/m ²)	51.8 ± 8.9	52.0 ± 9.0	51.2 ± 8.7	0.32
Waist girth (cm)	140.6 ± 17.7	141.7 ± 17.4	135.5 ± 18.5	<0.0001
CRP (mg/l)	11.04 ± 9.12	11.22 ± 9.16	10.42 ± 9.00	0.05
Fasting glucose (mmol/L)	6.53 ± 2.32	6.85 ± 2.41	5.11 ± 0.98	<0.0001
Lipid profile (mmol/L)				
TG	1.83 ± 1.08	1.98 ± 1.12	1.17 ± 0.37	<0.0001
Total-C	4.70 ± 0.95	4.68 ± 0.98	4.80 ± 0.82	0.05
LDL-C	2.67 ± 0.83	2.65 ± 0.84	2.80 ± 0.75	0.02
HDL-C	1.24 ± 0.35	1.18 ± 0.32	1.49 ± 0.37	<0.0001
Total-C/HDL-C	4.03 ± 1.29	4.17 ± 1.34	3.33 ± 0.74	<0.0001
Blood Pressure (mm Hg)				
SBP	139.0 ± 17.1	140.0 ± 17.3	134.6 ± 15.6	0.0006
DBP	83.8 ± 11.5	84.0 ± 11.7	83.1 ± 10.3	0.04

Boldface values represent statistically significant differences ($P \leq 0.05$). Values are presented as mean ± SD. Abbreviations : MetS, metabolic syndrome; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; TG, triglycerides; Total-C, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; SD, standard deviation.

Table 2: Genotype distribution and localization of selected *NMT1* SNPs.

SNPs	Number of genotypes	Common HMZ (WT)	HTZ	Rare HMZ	Localization ^a	Other designation ^b	Region	MAF	HWE <i>P</i> value
rs12449933	1737	1060	587	90	chr17:43137201	c.-1497C>T	Intron 1	0.22	0.46
rs41484746	1740	1458	268	14	chr17:43142664	c.131+3836A>G	Intron 1	0.09	0.66
rs8066395	1716	1108	547	61	chr17:43147582	c.131+8754A>G	Intron 1	0.19	0.52
rs2157839	1734	772	765	197	chr17:43151400	c.132-7612T>C	Intron 1	0.33	0.72
rs2157840	1731	530	843	358	chr17:43151473	c.132-7539G>T	Intron 1	0.45	0.50
rs1005136	1725	550	834	341	chr17:43164246	c.385+226G>T	Intron 3	0.44	0.44
rs10491142	1738	1308	400	30	chr17:43167863	c.386-3190G>C	Intron 3	0.13	0.93
rs2239921	1735	1585	149	1	chr17:43170907	c.386-146C>T	Intron 3	0.04	0.19
rs2239922	1740	1492	234	14	chr17:43175906	c.870C>T	Exon 7	0.08	0.15
rs2239923	1733	850	728	155	chr17:43176804	c.916C>T	Exon 8	0.30	0.96
rs1053733	1730	585	829	316	chr17:43183028	c.*21G>A	Exon 12 (3'-UTR)	0.42	0.46
rs2269746	1740	1535	198	7	chr17:43185023	c.*2016C>A	Exon 12 (3'-UTR)	0.06	0.82

^a Position according to genome build 37. ^b Reference sequence : NM_021079. Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; HMZ, homozygote; WT, wild-type; HTZ, heterozygote; MAF, minor allele frequency; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 3: Significant genotype differences identified between *NMT1* SNPs, subjects' characteristics, CRP, fasting glucose, lipid profile and blood pressure.

Phenotypes	rs12449933				rs41484746		
	Means ^a			P value ^b	Means		P value
	Common HMZ (WT)	HTZ	Rare HMZ		Common HMZ (WT)	Rare allele carrier	
Number of subjects (N)	1055	584	90	—	1450	281	—
BMI (kg/m ²)	51.8 ± 8.8	51.5 ± 8.0	50.8 ± 10.1	0.54	51.8 ± 8.7	50.8 ± 8.2	0.06
Waist girth (cm)	140.7 ± 17.9	140.7 ± 17.0	138.0 ± 20.3	0.25	140.8 ± 17.9	139.1 ± 16.8	0.06
CRP Protein (mg/l)	10.88 ± 8.32	10.53 ± 8.31	11.67 ± 9.11	0.87	10.96 ± 8.39	10.01 ± 8.10	0.49
Fasting glucose (mmol/l)	6.53 ± 2.33	6.52 ± 2.29	6.85 ± 2.47	0.42	6.53 ± 2.33	6.61 ± 2.33	0.45
Lipid profile (mmol/l)							
TG	1.82 ± 1.08	1.78 ± 0.94	2.15 ± 1.58	0.08	1.83 ± 1.06	1.82 ± 1.09	0.22
Total-C	4.68 ± 0.93	4.69 ± 0.95	4.84 ± 0.87	0.49	4.69 ± 0.92	4.70 ± 1.01	0.97
LDL-C	2.67 ± 0.83	2.69 ± 0.82	2.72 ± 0.75	0.36	2.67 ± 0.81	2.71 ± 0.88	0.51
HDL-C	1.23 ± 0.32	1.24 ± 0.38	1.25 ± 0.48	0.54	1.24 ± 0.36	1.22 ± 0.28	0.81
Total-C/HDL-C	4.01 ± 1.22	4.03 ± 1.42	4.19 ± 1.30	0.27	4.02 ± 1.32	4.01 ± 1.10	0.90
Blood pressure (mmHg)							
SBP	138.9 ± 16.6	138.8 ± 16.7	137.5 ± 17.8	0.33	138.7 ± 16.6	139.4 ± 17.3	0.56
DBP	83.8 ± 11.5	83.9 ± 10.7	82.6 ± 11.3	0.41	83.9 ± 11.3	82.96 ± 10.8	0.30
Phenotypes	rs2239921			P value	rs2239923		
	Means		P value		Means		P value
	Common HMZ (WT)	Rare allele carrier			Common HMZ (WT)	HTZ	
Number of subjects (N)	1578	148	—	846	725	155	—
BMI (kg/m ²)	51.7 ± 8.5	52.0 ± 9.7	0.66	51.5 ± 8.6	51.7 ± 8.4	52.5 ± 9.5	0.30
Waist girth (cm)	140.5 ± 17.5	141.9 ± 20.1	0.18	140.8 ± 17.5	140.3 ± 18.0	141.0 ± 17.8	0.81
CRP Protein (mg/l)	10.72 ± 8.25	11.83 ± 9.47	0.73	10.64 ± 8.42	10.96 ± 8.38	11.57 ± 7.93	0.27
Fasting glucose (mmol/l)	6.56 ± 2.35	6.31 ± 2.04	0.69	6.52 ± 2.27	6.53 ± 2.30	6.62 ± 2.56	0.87
Lipid profile (mmol/l)							
TG	1.81 ± 1.00	1.93 ± 1.64	0.45	1.82 ± 1.06	1.82 ± 1.09	1.80 ± 1.02	0.85
Total-C	4.68 ± 0.94	4.76 ± 0.89	0.81	4.70 ± 0.94	4.69 ± 0.93	4.64 ± 0.92	0.74
LDL-C	2.67 ± 0.82	2.74 ± 0.81	0.93	2.69 ± 0.82	2.67 ± 0.83	2.59 ± 0.79	0.96
HDL-C	1.24 ± 0.36	1.21 ± 0.29	0.71	1.24 ± 0.37	1.23 ± 0.35	1.26 ± 0.27	0.05
Total-C/HDL-C	4.01 ± 1.30	4.15 ± 1.23	0.47	4.06 ± 1.43	4.02 ± 1.16	3.82 ± 1.02	0.40
Blood pressure (mmHg)							
SBP	138.9 ± 16.7	138.1 ± 17.6	0.03	139.3 ± 17.3	138.7 ± 16.6	136.9 ± 13.9	0.82
DBP	83.9 ± 11.1	81.2 ± 11.5	<0.0001	83.9 ± 11.4	83.4 ± 11.1	84.2 ± 10.5	0.34

Phenotypes	rs2269746			P value	rs8066395			P value
	Means		Means					
	Common HMZ (WT)	Rare allele carrier	Common HMZ (WT)		Rare allele carrier			
Number of subjects (N)	1527	204	—	1102	605	—		
BMI (kg/m ²)	51.6 ± 8.5	52.3 ± 9.2	0.39	51.8 ± 8.9	51.5 ± 8.0	0.50		
Waist girth (cm)	140.5 ± 17.7	140.9 ± 18.0	0.88	140.4 ± 18.0	140.8 ± 17.2	0.46		
CRP Protein (mg/l)	10.79 ± 8.34	10.89 ± 8.48	0.29	11.21 ± 8.52	10.03 ± 7.99	0.03		
Fasting glucose (mmol/l)	6.56 ± 2.34	6.40 ± 2.22	0.93	6.61 ± 2.39	6.40 ± 2.20	0.26		
Lipid profile (mmol/l)								
TG	1.83 ± 1.10	1.77 ± 0.83	0.97	1.85 ± 1.15	1.78 ± 0.91	0.58		
Total-C	4.71 ± 0.94	4.56 ± 0.89	0.004	4.69 ± 0.93	4.71 ± 0.94	0.70		
LDL-C	2.69 ± 0.82	2.56 ± 0.81	0.006	2.67 ± 0.82	2.70 ± 0.83	0.93		
HDL-C	1.24 ± 0.36	1.21 ± 0.32	0.61	1.23 ± 0.34	1.25 ± 0.37	0.84		
Total-C/HDL-C	4.03 ± 1.29	3.99 ± 1.32	0.18	4.05 ± 1.33	3.99 ± 1.23	0.64		
Blood pressure (mmHg)								
SBP	138.7 ± 16.7	140.1 ± 17.4	0.12	138.6 ± 16.7	139.2 ± 16.8	0.61		
DBP	83.6 ± 11.1	84.8 ± 11.7	0.42	83.7 ± 11.1	83.9 ± 11.3	0.78		

Phenotypes	rs2157840				P value	rs1005136				P value
	Means			Means						
	Common HMZ (WT)	HTZ	Rare HMZ	Common HMZ (WT)		HTZ	Rare HMZ			
Number of subjects (N)	527	838	357	—	547	829	340	—		
BMI (kg/m ²)	52.2 ± 9.2	51.5 ± 8.2	51.5 ± 8.6	0.26	52.1 ± 9.2	51.5 ± 8.2	51.5 ± 8.7	0.23		
Waist girth (cm)	140.9 ± 17.8	140.1 ± 17.6	141.2 ± 17.8	0.63	140.6 ± 17.8	140.2 ± 17.8	141.3 ± 17.7	0.59		
CRP Protein (mg/l)	11.78 ± 8.59	10.36 ± 8.29	10.57 ± 8.13	0.04	11.81 ± 8.60	10.21 ± 8.23	10.63 ± 8.19	0.03		
Fasting glucose (mmol/l)	6.55 ± 2.30	6.54 ± 2.38	6.50 ± 2.22	0.72	6.53 ± 2.31	6.55 ± 2.38	6.47 ± 2.12	0.43		
Lipid profile (mmol/l)										
TG	1.86 ± 1.25	1.79 ± 0.95	1.86 ± 1.06	0.78	1.86 ± 1.25	1.79 ± 0.96	1.86 ± 1.02	0.85		
Total-C	4.67 ± 0.93	4.69 ± 0.95	4.73 ± 0.93	0.98	4.67 ± 0.94	4.69 ± 0.93	4.75 ± 0.94	0.86		
LDL-C	2.64 ± 0.81	2.68 ± 0.84	2.72 ± 0.80	0.74	2.64 ± 0.82	2.68 ± 0.83	2.73 ± 0.80	0.43		
HDL-C	1.23 ± 0.29	1.23 ± 0.35	1.25 ± 0.44	0.38	1.23 ± 0.29	1.23 ± 0.35	1.26 ± 0.44	0.68		
Total-C/HDL-C	3.98 ± 1.11	4.03 ± 1.32	4.08 ± 1.46	0.77	3.99 ± 1.17	4.02 ± 1.30	4.09 ± 1.47	0.71		
Blood pressure (mmHg)										
SBP	139.0 ± 16.4	138.5 ± 17.0	139.5 ± 16.5	0.92	138.8 ± 16.3	138.7 ± 17.2	139.0 ± 16.3	0.99		
DBP	84.1 ± 11.0	83.4 ± 11.3	84.0 ± 11.3	0.67	83.9 ± 11.0	83.5 ± 11.2	83.9 ± 11.4	0.68		

Boldface values represent statistically significant differences ($P \leq 0.05$). ^a Values presented (means ± SD) are untransformed and unadjusted. ^b P values obtained are adjusted for the effect of age, sex, BMI and medication use except for BMI and waist girth which were adjusted for age and sex. Abbreviations: HMZ, homozygote; WT, wild-type; HTZ, heterozygote; N, number; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; TG, triglycerides; Total-C, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; SD, standard deviation.

Table 4: Association of phenotype-associated SNPs with gene methylation levels.

SNP	cg16594296 Promoter	cg10755730 Promoter	cg21452443 Promoter	cg24354954 Promoter	cg07481784 Promoter	cg21554013 Promoter	cg02077631 Promoter	cg21132931 Promoter	cg22356484 Exon 1	cg06208294 Intron 1	cg00405568 Intron 1	cg09377882 Intron 1	cg09214551 Intron 1
rs2239921	0.80	0.39	0.47	0.57	0.71	0.06	0.21	0.38	0.55	0.62	0.63	0.53	0.59
rs2239923	0.12	0.03	0.31	0.45	0.81	0.44	0.14	0.51	0.78	0.60	0.77	0.98	0.34
rs2269746	0.76	0.28	0.51	0.99	0.34	0.83	0.20	0.74	0.72	0.44	0.56	0.93	0.17
rs8066395	0.93	0.41	0.90	0.48	0.50	0.63	0.67	0.82	0.04	0.68	0.79	0.76	0.59
rs2157840	0.15	0.57	0.37	0.19	0.12	0.68	0.18	0.78	0.89	0.97	0.45	0.46	0.43
rs1005136	0.15	0.57	0.37	0.19	0.12	0.68	0.18	0.78	0.89	0.97	0.45	0.46	0.43

SNP	cg03287877 Intron 1	cg08860622 Intron 1	cg00693004 Intron 1	cg04013970 Intron 1	cg02888886 Intron 3	ch_17_1184801R Intron 3	cg17942929 Intron 3	cg05349016 Intron 3	cg16080654 Exon 8	cg24136288 Exon 12 (3'-UTR)	cg22542420 Exon 12 (3'-UTR)	cg11583751 Exon 12 (3'-UTR)	cg05322982 Exon 12 (3'-UTR)
rs2239921	0.21	0.57	0.71	0.34	0.34	0.83	0.24	0.11	0.04	0.77	0.92	0.40	0.32
rs2239923	0.36	0.54	0.04	0.38	0.28	0.93	0.37	0.38	0.17	0.98	0.14	0.08	0.91
rs2269746	0.39	0.41	0.07	0.73	0.98	0.35	0.74	0.40	0.52	0.004	0.67	0.34	0.83
rs8066395	0.71	0.78	0.07	0.90	0.82	0.81	0.51	0.32	0.92	0.39	0.26	0.92	0.72
rs2157840	0.36	0.86	<0.0001	0.13	0.17	0.62	0.33	0.07	0.20	0.02	0.0004	0.41	0.71
rs1005136	0.36	0.86	<0.0001	0.13	0.17	0.62	0.33	0.07	0.20	0.02	0.0004	0.41	0.72

Boldface values represent statistically significant differences ($P \leq 0.05$). P values for associations were obtained from a subset of 14 obese subjects (7 MetS+ and 7 MetS-). CpG sites positions according to genome build 37.

Table 5: Correlation of gene methylation with gene expression levels for SNPs-associated CpG sites in a subset of 14 severely obese subjects.

CpG site ID	Localization ^a	Region	Correlation coefficient ^b	<i>P</i> value	Number of individuals tested
cg10755730	chr17:43138257	Promoter	0.574	0.04	14
cg22356484	chr17:43138772	Exon 1	-0.079	0.81	13
cg00693004	chr17:43151433	Intron 1	0.277	0.36	14
cg16080654	chr17:43176852	Exon 8	-0.428	0.14	14
cg24136288	chr17:43183150	Exon 12 (3'UTR)	-0.008	0.98	14
cg22542420	chr17:43183176	Exon 12 (3'UTR)	-0.112	0.71	14

Boldface values represent statistically significant differences ($P \leq 0.05$). ^aCpG sites positions according to genome build 37. ^bPearson's *r* correlation coefficient.

Chapitre 3 : L'allèle rare du SNP rs10838599 de *DGKZ* est associé avec un niveau variable de cholestérol HDL chez les patients avec obésité sévère.

The Rare Allele of DGKZ SNP rs10838599 is Associated with Variability in HDL-Cholesterol Levels among Severely Obese Patients.

Cet article a été publié dans le journal *Integrative Obesity and Diabetes* en mai 2016 [2]. J'y ai effectué les analyses statistiques et la rédaction du manuscrit. De plus, les résultats de cet article ont été présentés sous forme de présentation par affiche au congrès de la *Canadian Nutrition Society (CNS)* du 5 au 7 mai 2016 à Ottawa, Ontario.

Résumé de l'article

Introduction: La diacylglycérol kinase zeta est une importante enzyme du métabolisme des lipides. Elle catalyse l'interconversion du diacylglycérol (DAG) en acide phosphatidique (PA). Son gène *DGKZ* a précédemment été établi comme surexprimé et hypométhylé dans le TAV de patients sévèrement obèses SMet+ vs SMet-.

Objectif: Vérifier les associations entre les SNPs de *DGKZ* et des composantes du SMet.

Méthodes: La cohorte incluait 1752 individus obèses subissant une chirurgie bariatrique. Les associations entre cinq SNPs de *DGKZ* et les composantes du SMet ont été testées. Ensuite, l'implication de la méthylation entre la variation et l'expression génique était testée.

Résultats: Les homozygotes de l'allèle rare pour le SNP rs10838599 ont démontré des niveaux de C-HDL plus élevés par rapport aux autres génotypes. Aucune association n'a été trouvée entre ce SNP et le niveau de méthylation du gène.

Conclusion: Ces résultats suggèrent que *DGKZ* module les niveaux plasmatiques de C-HDL.

The Rare Allele of *DGKZ* SNP rs10838599 is Associated with Variability in HDL-Cholesterol Levels among Severely Obese Patients.

Stéphanie Bégin^{1,2}, Frédéric Guénard^{1,2}, André Tchernof^{2,3}, Yves Deshaies^{3,4}, Louis Pérusse^{1,5}, Frédéric-Simon Hould^{3,6}, Stéfane Lebel^{3,6}, Picard Marceau^{3,6} and Marie-Claude Vohl^{1,2} *

1. Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, QC, Canada
2. School of Nutrition, Laval University, Quebec, QC, Canada
3. Quebec Heart and Lung Institute, Quebec, QC, Canada
4. Department of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada
5. Department of Kinesiology, Laval University, Quebec, QC, Canada
6. Department of Surgery, Laval University, Quebec, QC, Canada

* Corresponding author:

Marie-Claude Vohl Ph.D.

Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF)

2440 Hochelaga Blvd.

Quebec, Canada

G1V 0A6

Tel.: (418) 656-2131 ext. 4676, Fax: (418) 656-5877

Email: marie-claude.vohl@fsaa.ulaval.ca

ABSTRACT

Introduction: Diacylglycerol kinase-zeta, one of the ten isoforms of DGKs expressed in mammals is an important enzyme of lipid metabolism. It catalyzes the interconversion of diacylglycerol and phosphatidic acid, two major second messengers. Its gene *DGKZ* has been previously identified as being overexpressed and undermethylated in visceral adipose tissue of patients with (MetS+) versus without (MetS-) the metabolic syndrome (MetS).

Objective: The aim of this study was to investigate the associations between *DGKZ* gene polymorphisms (SNPs) and phenotypes related to MetS [BMI, waist girth, CRP, fasting glucose, lipid profile [triglycerides, total-cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol (HDL-C)], resting systolic and diastolic blood pressures]. **Methods:** The study sample included 1752 severely obese participants who underwent bariatric surgery. Associations between the five selected tSNPs of *DGKZ* and features of the MetS were tested. The effects of these SNPs on *DGKZ* methylation and expression levels were tested in subgroups of 32 and 14 obese subjects, respectively. Correlations between methylation and expression levels were also computed. **Results:** Homozygotes for the rare allele of rs10838599 displayed higher plasma HDL-C concentrations compared to the other genotype groups ($p=0.03$). For gene methylation, only a trend with the cg05412031 CpG site ($p=0.09$) was found for the single significantly phenotype-associated SNP. There was no significant correlation between *DGKZ* methylation at cg05412031 and expression levels. **Conclusion:** These results suggest that *DGKZ* SNP rs10838599 modulates plasma HDL-C levels thereby its gene contributes to the inter-individual variability observed in the cardiometabolic risk profile of patients with severe obesity.

Keywords: diacylglycerol, epigenetics, genomics, lipids, metabolic syndrome, obesity

Abbreviations: BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; DAG, diacylglycerol; DBP, diastolic blood pressure; DGK, diacylglycerol kinase; HDL-C, high-density lipoprotein

cholesterol; HMZ, homozygote; HTZ, heterozygote; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; MetS, metabolic syndrome; PA, phosphatidic acid; SBP, systolic blood pressure; SNP, single nucleotide polymorphism; TG, triglycerides; VAT, visceral adipose tissue

Introduction

The metabolic syndrome (MetS) is a constellation of risk factors associated with cardiovascular diseases, and could explain the mortality related to obesity [1]. However, not all obese individuals develop MetS [2]. Consequently, the analysis of obesity etiology is critical to better understand and prevent its condition of epidemic proportions worldwide [3]. Differences in DNA sequence of obese individuals affected (MetS+) and unaffected (MetS-) by MetS can be examined. However, genetic factors are not the only contributor to the heterogeneous obesity phenotype. Epigenetic variations have also been associated with the development of metabolic disorders [4, 5], including low HDL-cholesterol (HDL-C) levels, as observed among obese individuals [6]. Beside cholesterol transport, HDL-C particles also have antioxidant, anti-inflammatory and antithrombotic properties [7]. *DGKZ* gene is coding for the protein diacylglycerol kinase (DGK)-zeta, one of the ten DGK isoforms expressed in mammals [8]. It catalyzes the conversion of diacylglycerol (DAG) into phosphatidic acid (PA) and inversely [9], two essential lipid metabolic intermediates in the constitution of membranes and signal transduction [10].

The *DGKZ* gene was identified by our team among a list of 488 additional loci as being differentially expressed in visceral adipose tissue (VAT) of MetS+ versus MetS- subjects [11]. Afterwards, *DGKZ* was shown to be differentially methylated in VAT of obese patients discordant for MetS [12]. We then hypothesized that DNA genetic/epigenetic variations in *DGKZ* are associated with MetS components and that CpG methylation levels are associated with the presence of obesity-related metabolic complications based on the role of methylation in the regulation of gene expression [13]. The aim of this study was therefore to determine the effects of *DGKZ* genetic and epigenetic variations on the metabolic complications of obesity.

MATERIAL AND METHODS

Subjects Selection

Among patients undergoing bariatric surgery (biliopancreatic diversion with duodenal switch) at the Québec Heart and Lung Institute (IUCPQ) (Québec City, Québec, Canada), 1752 severely obese men (N=545) and women (N=1207) were consecutively recruited. There were three inclusion criteria: the participants should present a BMI higher or equivalent to 35, be French-Canadian and attend for a bariatric surgery at the IUCPQ. The surgical protocol is described elsewhere [14]. Body weight, height, waist girth, plasma lipid [triglycerides (TG), total-cholesterol (total-C), LDL-cholesterol (LDL-C) and HDL-C] and resting systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured before the surgery using standardized procedures [15]. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations were measured with a high sensitivity-CRP immunoassay using a monoclonal antibody coated on polystyrene particles. The presence of MetS was determined using the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) criteria [16]. Tissue specimens were obtained from the Biobank of the IUCPQ according to institutionally-approved management modalities. All subjects included in the study provided a written informed consent previously approved by the local ethics committee.

Genotyping

DNA was extracted from blood buffy coat using the GenElute Blood Genomic DNA kit (Sigma, St Louis, MO). Four tagging single nucleotide polymorphisms (tSNPs) were selected for the analysis based on differential expression and methylation of the *DGKZ* gene established in a previous dataset [11, 12]. These SNPs were genotyped using the QuantStudio™ 12K Flex OpenArray® AccuFill™ system (Applied Biosystems), and analyzed with TaqMan Genotyper v1.3 (Life Technologies). The inclusion of the rs34470543 SNP in the current study is attributable to its close localization to the cg12856521 CpG site,

previously found to be differentially methylated between MetS+ and MetS- subjects [17]. The tagger selection algorithm of the Haploview software (pairwise tagging, $R^2 \geq 0.80$) was used for analysis of selected SNPs spanning promoter (2 kb), coding and intronic regions of the *DGKZ* gene in addition to the 3' gene region (2 kb) [17]. This strategy allowed covering 100% of the genetic variability of the common polymorphisms ($MAF \geq 1\%$) at the *DGKZ* locus in the Caucasian population (CEU HapMap).

DNA methylation analysis

From the original sample, a subgroup of 32 obese individuals was used for DNA methylation analysis, including the 14 subjects (MetS+, N=7; MetS-, N=7) selected for gene expression profiling [11]. The 18 additional obese individuals (MetS+, N=9; MetS-, N=9) were selected to fulfill initial selection criteria [11] and to represent extremes of the MetS diagnosis criteria spectrum. Samples of 200 mg of VAT were used to achieve genomic DNA extraction using the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). Bisulfite conversion was conducted on 1 μ g of DNA, and quantitative DNA methylation analysis was carried out at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montréal, Canada). Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) covering more than 485000 methylation sites at single-nucleotide resolution were processed according to the manufacturer's instructions. The GenomeStudio software version 2011.1 (Illumina Inc.) and the methylation module were used for visualisation and analysis of the methylation data. Methylation levels (beta values; β) were estimated as the ratio of signal intensity of the methylated alleles to the sum of methylated and unmethylated intensity signals of the alleles (β value = $C/(T+C)$). We applied internal control probe pairs for data correction (background subtraction and normalization). The GenomeStudio Methylation Module was used to extract CpG sites located within the *DGKZ* locus and promoter region, thus leading to a total of 66 CpG sites analyzed. Based on the differentially methylated CpG

site cg12856521 (chr11:46389249, genome build 37), *DGKZ* was identified as differentially methylated (Diffscore = -235.58).

Gene expression

The protocol leading to the selection of *DGKZ* for the current study and its expression data presented here were retrieved from a previous study aimed at the identification of differentially methylated genes between MetS+ and MetS- severely obese men [11]. Even if the *DGKZ* gene is not listed in the tables due to the large number of genes discovered, this investigation led to its determination as being overexpressed within VAT of MetS+ versus MetS- subjects (1.21-fold; $p=0.004$).

Statistical analysis

At first, differences in metabolic biomarkers were tested between MetS+ and MetS- individuals of the study cohort. Gene expression level differences derived from microarray analysis between MetS+ and MetS- groups were tested using the unpaired Student's *t* test. For the five selected *DGKZ* tSNPs, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was verified. For SNPs with genotype frequency of rare homozygotes below 5% (2 SNPs: rs3809047 and rs3740976), homozygotes for the rare allele were merged to heterozygotes for statistical analysis. The associations between SNPs and MetS components were tested using the GLM procedure with adjustments for age, sex, BMI and medication to treat MetS features when appropriate. When a significant SNP effect was identified, all pairwise comparisons between genotype groups were tested using least squares means. Pearson correlation coefficients were computed to assess the relationship between gene methylation, expression and MetS components. *P* values were calculated for all associations and were considered statistically significant if the *P* value was less than 0.05. Phenotypic data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed with SAS software version 9.3.

RESULTS

Cohort Description

The current study included 1752 subjects (545 men and 1207 women) who underwent bariatric surgery. From those, 1745 were classified as being MetS+ (n=1428) or MetS- (n=317 or 20.19%). Patients' characteristics are presented in Table 1. Briefly, the MetS+ group was older and showed significantly higher waist girth, fasting glucose, TG, total-C/HDL-C ratio and blood pressure (SBP and DBP), as well as lower plasma total-C, LDL-C and HDL-C levels than the MetS- group.

Identification of *DGKZ* SNPs and selection of tSNPs

Among the 5 selected SNPs, 4 were located in introns whereas SNP rs34470543 was located in an exon (Table 2). These 5 SNPs were further genotyped in the entire cohort of 1752 participants. All SNPs were in HWE and genotype distribution is shown in Table 2.

Association of *DGKZ* SNPs

Associations between *DGKZ* SNPs and fasting plasma concentrations of glucose, TG, total-C, LDL-C, HDL-C, CRP and blood pressure (DBP and SBP) were tested taking into account the potential confounding effects of age, sex, and BMI. A significant association was found for rs10838599, homozygotes for the rare allele of rs10838599 displaying elevated HDL-C levels (p=0.03) compared to the two other genotype groups (Table 3). A trend toward higher DBP (p=0.08; 83.67 ± 10.91 vs. 83.43 ± 11.30 vs. 85.71 ± 11.97) was also observed. For rs3740976, a trend toward higher DBP (p=0.09; 84.32 ± 10.85 vs. 83.51 ± 11.30) was observed in rare allele carriers.

Gene methylation and expression analysis

To better understand the mechanism linking *DGKZ* genetic variations and cardiometabolic risk factors, we investigated the impact of these SNPs on gene methylation and expression levels in subgroups of 32 and 14 participants, respectively. Methylation levels were available for 66 CpG sites randomly distributed within the gene, their precise locations are presented in Table 4. The impact on methylation levels was tested only for SNP (rs10838599) found to be significantly associated with one cardiometabolic risk factor. For rs10838599, only a trend for genotype differences in methylation levels at the cg05412031 CpG site ($p=0.09$) was noted. No significant correlation was found between methylation levels at this CpG site and *DGKZ* expression levels.

Discussion

Our group previously observed that *DGKZ* was overexpressed [11] and undermethylated [12] in VAT of MetS+ vs MetS- severely obese subjects. *DGKZ* was thus revealed as a candidate gene having a potential effect on the development of obesity and MetS. Accordingly, it was appealing to test its associations with features of MetS. The ten diacylglycerol kinase isoforms expressed in mammals [8], including DGK-zeta, are important enzymes of lipid metabolism, because they are involved in the regulation of two major lipid messengers [18], controlling DAG and PA levels in cells [19]. The second messenger DAG regulates the activity of Rac1 and RhoA, two Rho GTPases [20] affecting the actin filaments of the cytoskeleton [21]. An increase in DAG, modulated by DGK, appears to reduce glycogen synthesis stimulated by insulin in liver, also decreasing the suppression of gluconeogenesis [21]. Therefore, the activity of DAG and PA may be altered by obesity and type 2 diabetes [22]. Specifically, the DGK-zeta isoform is expressed in diverse tissues, especially in brain [23]. At first, it is in the cell cytoplasm but can be translocated to various organelles [24]. Such translocation may be attributable to its unique myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) phosphorylation domain [19, 23]. The overexpression of *DGKZ* has been associated with decreased cell cycle progression [19], as DAG is important for this process as well as for cell differentiation [25]. Moreover, a previous study reported a relationship between DGK-delta and insulin resistance [26], but has not been reported for other isoforms. Insulin resistance may be an important event in the development of MetS, inducing hyperglycemia and dyslipidemia, although not all MetS+ patients are insulin resistant [27, 28]. In addition, DAG is increased in humans with MetS and with reduced HDL-C levels [29]. DAG is also part of the pathway leading to the translocation of GLUT4 to the cell membrane [30].

Among the 5 tSNPs selected, only one was significantly associated with obesity-related metabolic complications in the present study. More specifically, rare allele homozygotes of rs10838599 had significantly higher plasma HDL-C levels compared to

heterozygotes and homozygotes for the wild-type allele. To our knowledge, this study is the first to report an association of *DGKZ* gene variations and cardiometabolic risk factors in severely obese patients. Rs10838599 wild-type allele was associated with decreased plasma HDL-C levels, a lipid disturbance associated with an alteration of free fatty acid metabolism [16, 31]. Low plasma HDL-C level is a criterion of MetS and an important indicator of increased cardiovascular risk [1, 32]. A reduction of HDL-C concentration of 10% increases the risk of CVD by 13% [33, 34]. HDL-C has been shown, with LDL-C and in combination with other growth factors, to stimulate cell proliferation of both endothelial and smooth muscle cells [35]. The capacity of HDL-C to activate protein kinase C (PKC) has also been reported [36], this enzyme being one of the four main proteins having an activity modulated by DAG [37, 38]. Inversely, PKC regulates levels and activity of the DGK-zeta protein in the nucleus [25]. It possibly suggests that HDL-C plays a role in transduction of the signal cascade, in the regulation of cellular events [39], and could be linked to DAG metabolism. Besides, PA has deleterious effects on HDL-C functionality [40]. PA is in low abundance in HDL-C particles known for their heterogeneous composition and structure [41].

No significant association was found between the phenotype-associated SNP rs10838599 and methylation levels. There was also no correlation between gene methylation and expression levels. These results suggest that DNA sequence and methylation variations are not significant contributors to *DGKZ* expression levels, at least in severely obese patients. As DAG is a major regulator of many important biological processes, its abundance in cells might be tightly controlled, which is a key role for DGK [9]. Expression of the gene coding for DGK isoforms such as *DGKZ*, may be closely regulated accordingly by epigenetic mechanisms, influenced by environmental factors such as diet [42]. Through excessive intake in food, an accumulation of TG can lead to fat storage in ectopic sites, which is associated with dyslipidemia and other obesity-related metabolic complications such as hypertension, glucose intolerance [43], and insulin resistance [44]. The lipid profile measured in plasma has been shown to be an indicator of both genetic and

environmental backgrounds [29]. Moreover, the expression of *DGKZ* has been described to be stimulated in hypothalamus by a high-fat diet [45]. Thus, this suggests that an excess of fat intake may influence the expression level of DGK genes. Besides, DAG might also be playing a role in hypertension pathophysiology [46], but the current study only revealed a trend between two of *DGKZ* SNPs, rs10838599 and rs3740976, and higher DBP for rare allele carriers. Nevertheless, altered lipid metabolism and hypertension are associated [47].

Some limitations need to be taken into account when interpreting the results presented in this study. First, a relatively small number of obese participants were available to measure gene methylation and expression levels in VAT. The limitation to 32 subjects used for methylation analysis is due to the highly stringent selection criteria. For expression analysis, the number of individuals included in the subgroup was limited to 14 because this part of methodology was retrieved from a previous study [11]. However, identifying the potential mechanism relating phenotype-associated SNPs to MetS was, however, a secondary objective. Also, the effects of *DGKZ* SNPs may have been altered by the systemic inflammation generated by obesity [48], so more studies with different study cohorts are needed.

Conclusion

With this study, we found that *DGKZ* rs10838599 is associated with plasma HDL-C thereby suggesting that it may contribute to the inter-individual variability observed in the cardiometabolic risk profile of patients with severe obesity. However, methylation levels of CpG sites were not associated to this gene variation.

Authors' Contributions

SBégin wrote the article; SBégin and FG completed the statistical analyses; MCV, AT, YD and LP established study design; FSH, SL and PM recruited patients, collected clinical data and samples; SBégin and MCV have principal liability for final content.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge the invaluable collaboration of surgeons Simon Biron, Odette Lescelleur, Laurent Biertho and Simon Marceau of the IUCPQ bariatric surgery team, who have sampled adipose tissue for this project and contributed to the organization of the clinical setup needed to perform our studies. We express our gratitude to Christine Racine and Caroline Gagnon from the IUCPQ. We also thank Alain Houde and Catherine Raymond for technical assistance and sample management. MCV is Canada Research Chair in Genomics Applied to Nutrition and Health recipient.

Funding Information

This work was supported by a grant-in-aid from Heart and Stroke Foundation of Canada.

AT receives research funding from Johnson & Johnson Medical Companies for studies unrelated to the present publication.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Hoffman, E.L., T. VonWald, and K. Hansen, *The metabolic syndrome*. S D Med, 2015. **Spec No**: p. 24-8.
2. Hamer, M. and E. Stamatakis, *Metabolically healthy obesity and risk of all-cause and cardiovascular disease mortality*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(7): p. 2482-8.
3. Ogden, C.L., et al., *The epidemiology of obesity*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2087-102.
4. Wang, J., et al., *Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(2): p. 282-301.
5. Martinez, J.A., et al., *Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes*. Adv Nutr, 2014. **5**(1): p. 71-81.
6. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
7. Florentin, M., et al., *Multiple actions of high-density lipoprotein*. Curr Opin Cardiol, 2008. **23**(4): p. 370-8.
8. Sakane, F., et al., *Diacylglycerol kinases: why so many of them?* Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(7): p. 793-806.
9. Cai, J., et al., *Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(9): p. 942-8.
10. Rincon, E., et al., *Diacylglycerol kinase zeta: at the crossroads of lipid signaling and protein complex organization*. Prog Lipid Res, 2012. **51**(1): p. 1-10.
11. Bouchard, L., et al., *ZFP36: a promising candidate gene for obesity-related metabolic complications identified by converging genomics*. Obes Surg, 2007. **17**(3): p. 372-82.
12. Guenard, F., et al., *Differential methylation in visceral adipose tissue of obese men discordant for metabolic disturbances*. Physiol Genomics, 2014. **46**(6): p. 216-22.
13. Barros, S.P. and S. Offenbacher, *Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease*. J Dent Res, 2009. **88**(5): p. 400-8.
14. Vohl, M.C., et al., *A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men*. Obes Res, 2004. **12**(8): p. 1217-22.
15. Robitaille, J., et al., *The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study*. Clin Genet, 2003. **63**(2): p. 109-16.
16. Expert Panel on Detection, E.a.T.o.H.B.C.A., *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol Adults (Adult Treatment Panel III)*, in *The Journal of the American Medical Association*. 2001. p. 2486.
17. Bakker, M.I., et al., *Genetic, household and spatial clustering of leprosy on an island in Indonesia: a population-based study*. BMC Med Genet, 2005. **6**: p. 40.

18. Goto, K., et al., *Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective*. Tohoku J Exp Med, 2008. **214**(3): p. 199-212.
19. Topham, M.K., et al., *Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta*. Nature, 1998. **394**(6694): p. 697-700.
20. Cai, K., et al., *Increased diacylglycerol kinase zeta expression in human metastatic colon cancer cells augments Rho GTPase activity and contributes to enhanced invasion*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 208.
21. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
22. Manneras-Holm, L., et al., *mRNA expression of diacylglycerol kinase isoforms in insulin-sensitive tissues: effects of obesity and insulin resistance*. Physiol Rep, 2015. **3**(4).
23. Bunting, M., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10230-6.
24. Topham, M.K. and R.M. Epand, *Mammalian diacylglycerol kinases: molecular interactions and biological functions of selected isoforms*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(6): p. 416-24.
25. Los, A.P., et al., *The retinoblastoma family proteins bind to and activate diacylglycerol kinase zeta*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 858-66.
26. Chibalin, A.V., et al., *Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance*. Cell, 2008. **132**(3): p. 375-86.
27. Mikhail, N., *The metabolic syndrome: insulin resistance*. Curr Hypertens Rep, 2009. **11**(2): p. 156-8.
28. Zhang, C., E.L. Klett, and R.A. Coleman, *Lipid signals and insulin resistance*. Clin Lipidol, 2013. **8**(6): p. 659-667.
29. Jove, M., et al., *Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype*. FASEB J, 2014. **28**(12): p. 5163-71.
30. Tsuchiya, A., T. Kanno, and T. Nishizaki, *Diacylglycerol promotes GLUT4 translocation to the cell surface in a PKCepsilon-dependent and PKClambda/iota and -zeta-independent manner*. Life Sci, 2013. **93**(5-6): p. 240-6.
31. Meikle, P.J. and M.J. Christopher, *Lipidomics is providing new insight into the metabolic syndrome and its sequelae*. Curr Opin Lipidol, 2011. **22**(3): p. 210-5.
32. Assmann, G., et al., *High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport*. Atherosclerosis, 1996. **124 Suppl**: p. S11-20.
33. Gordon, T., et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. Am J Med, 1977. **62**(5): p. 707-14.
34. Despres, J.P., et al., *HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study*. Atherosclerosis, 2000. **153**(2): p. 263-72.

35. Chen, J.K., et al., *Role of lipoproteins in growth of human adult arterial endothelial and smooth muscle cells in low lipoprotein-deficient serum*. J Cell Physiol, 1986. **129**(2): p. 207-14.
36. Porn, M.I., K.E. Akerman, and J.P. Slotte, *High-density lipoproteins induce a rapid and transient release of Ca²⁺ in cultured fibroblasts*. Biochem J, 1991. **279 (Pt 1)**: p. 29-33.
37. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
38. Brose, N., A. Betz, and H. Wegmeyer, *Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals*. Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(3): p. 328-40.
39. Mollers, C., et al., *High-density lipoprotein and low-density lipoprotein-mediated signal transduction in cultured human skin fibroblasts*. Cell Signal, 1995. **7**(7): p. 695-707.
40. Rached, F., et al., *Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(9): p. 1254-61.
41. Camont, L., et al., *Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(12): p. 2715-23.
42. Chaudhary, N., et al., *Epigenetic manifestation of metabolic syndrome and dietary management*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(2): p. 254-81.
43. Marcelin, G. and S. Chua, Jr., *Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(5): p. 588-93.
44. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 507-20.
45. Liu, Z., G.Q. Chang, and S.F. Leibowitz, *Diacylglycerol kinase zeta in hypothalamus interacts with long form leptin receptor. Relation to dietary fat and body weight regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5900-7.
46. Kulkarni, H., et al., *Plasma lipidomic profile signature of hypertension in Mexican American families: specific role of diacylglycerols*. Hypertension, 2013. **62**(3): p. 621-6.
47. Ferrari, P., et al., *Altered insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and dyslipidemia in individuals with a hypertensive parent*. Am J Med, 1991. **91**(6): p. 589-96.
48. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.

Table 1: Subjects' characteristics.

	All	MetS+	MetS-	P value
Number of Subjects (% male)	1752 (31.1)	1428 (33.6)	317 (20.2)	—
Age (years)	43.02 ± 10.62	43.96 ± 10.58	38.66 ± 9.75	<0.0001
BMI (kg/m ²)	51.8 ± 8.9	52.0 ± 9.0	51.2 ± 8.7	0.32
Waist girth (cm)	140.6 ± 17.7	141.7 ± 17.4	135.5 ± 18.5	<0.0001
CRP (mg/L)	11.04 ± 9.12	11.22 ± 9.16	10.42 ± 9.00	0.05
Fasting glucose (mmol/L)	6.53 ± 2.32	6.85 ± 2.41	5.11 ± 0.98	<0.0001
Lipid profile (mmol/L)				
TG	1.83 ± 1.08	1.98 ± 1.12	1.17 ± 0.37	<0.0001
Total-C	4.70 ± 0.95	4.68 ± 0.98	4.80 ± 0.82	0.05
LDL-C	2.67 ± 0.83	2.65 ± 0.84	2.80 ± 0.75	0.02
HDL-C	1.24 ± 0.35	1.18 ± 0.32	1.49 ± 0.37	<0.0001
Total-C/HDL-C	4.03 ± 1.29	4.17 ± 1.34	3.33 ± 0.74	<0.0001
Blood Pressure (mmHg)				
SBP	139.0 ± 17.1	140.0 ± 17.3	134.6 ± 15.6	0.0006
DBP	83.8 ± 11.5	84.0 ± 11.7	83.1 ± 10.3	0.04

Boldface values represent statistically significant differences ($P \leq 0.05$). Values are presented as mean ± SD. Abbreviations: MetS, metabolic syndrome; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; TG, triglycerides; Total-C, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; SD, standard deviation.

Table 2: Genotype distribution and localization of selected *DGKZ* SNPs.

SNPs	Number of genotypes	Common HMZ	HTZ	Rare HMZ	Localization	Other designation	Region	MAF	HWE <i>P</i> value
rs11038866	1735	804	755	176	chr11:46355932	c.212+895C>G	Intron 1	0.32	0.95
rs3809047	1704	1384	309	11	chr11:46367702	c.212+12665T>C	Intron 1	0.10	0.16
rs10838599	1751	864	742	145	chr11:46378708	c.213-10133G>T	Intron 1	0.29	0.42
rs34470543	1743	1743	0	0	chr11:46389250	c.369_370insC	Exon 3	1	-
rs3740976	1738	1315	396	27	chr11:46393757	c.975+37C>T	Intron 10	0.13	0.65

Table 3: Significant genotype differences identified between *DGKZ* SNPs, subjects' characteristics, CRP, fasting glucose, lipid profile and blood pressure.

Phenotypes	rs10838599				rs3740976		
	Means			<i>P</i> value	Means		<i>P</i> value
	Common HMZ (WT)	HTZ	Rare HMZ		Common HMZ (WT)	Rare allele carrier	
Number of subjects (N)	858	740	144	—	1309	422	—
BMI (kg/m ²)	51.9 ± 8.8	51.5 ± 8.3	51.51 ± 9.1	0.70	51.6 ± 8.6	51.9 ± 8.5	0.69
Waist girth (cm)	141.0 ± 17.9	140.1 ± 17.5	140.7 ± 18.3	0.53	140.1 ± 17.7	141.9 ± 17.7	0.14
CRP Protein (mg/L)	10.70 ± 8.21	10.79 ± 8.43	11.46 ± 8.75	0.59	10.75 ± 8.28	11.03 ± 8.61	0.54
Fasting glucose	6.51 ± 2.27	6.56 ± 2.32	6.56 ± 2.60	0.65	6.55 ± 2.30	6.53 ± 2.42	0.98
Lipid profile (mmol/L)							
TG	1.81 ± 0.97	1.84 ± 1.20	1.88 ± 0.99	0.32	1.82 ± 0.98	1.85 ± 1.30	0.48
Total-C	4.69 ± 0.95	4.67 ± 0.92	4.86 ± 0.99	0.10	4.70 ± 0.93	4.68 ± 0.97	0.83
LDL-C	2.67 ± 0.83	2.66 ± 0.79	2.80 ± 0.90	0.36	2.68 ± 0.82	2.66 ± 0.84	0.94
HDL-C	1.24 ± 0.37	1.21 ± 0.30	1.31 ± 0.46	0.03	1.24 ± 0.37	1.23 ± 0.30	0.48
Total-C/HDL-C	4.03 ± 1.41	4.03 ± 1.16	3.98 ± 1.20	0.48	4.04 ± 1.31	3.99 ± 1.23	0.45
Blood pressure (mmHg)							
SBP	138.9 ± 16.9	138.7 ± 16.8	139.3 ± 15.6	0.74	138.5 ± 16.5	139.6 ± 17.3	0.44
DBP	83.7 ± 10.9	83.4 ± 11.3	85.7 ± 12.0	0.08	83.5 ± 11.3	84.3 ± 10.9	0.09

Boldface values represent statistically significant results ($P \leq 0.05$). ^aValues presented (means ± SD) are untransformed and unadjusted. ^b*P* values obtained are adjusted for the effect of age, sex, BMI and medication use except for BMI and waist girth which were adjusted for age and sex. Abbreviations: HMZ, homozygote; WT, wild-type; HTZ, heterozygote; N, number; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; TG, triglycerides; Total-C, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; SD, standard deviation.

Table 4: Association of phenotype-associated SNP rs10838599 with gene methylation levels.

SNP	cg18908017 Promoter	cg24878090 Promoter	cg18765542 Promoter	cg21029403 Promoter	cg26650731 Promoter	cg05412031 Promoter	cg25151353 Promoter	cg07276415 Promoter	cg05214390 Promoter	cg14503180 Promoter	cg10503202 Promoter
rs10838599	0.95	0.99	0.58	0.23	0.91	0.09	0.24	0.94	0.65	0.39	0.10
SNP	cg15825186 Exon 1	cg24407308 Exon 1	cg04854089 Intron 1	cg10059056 Intron 1	cg09802018 Intron 1	cg22948808 Intron 1	cg22707438 Intron 1	cg15925492 Intron 1	cg20091215 Intron 1	cg06061966 Intron 1	cg07998213 Intron 1
rs10838599	0.27	0.36	0.38	0.44	0.94	0.87	0.48	0.93	0.34	0.70	0.86
SNP	cg05576959 Intron 1	cg13247398 Intron 1	cg20029347 Intron 1	cg21663341 Intron 1	cg03519157 Intron 1	cg20666386 Intron 1	cg07701241 Intron 1	cg00530720 Intron 1	cg15868421 Intron 1	cg09039436 Intron 1	cg03044514 Intron 1
rs10838599	0.55	0.66	0.40	0.51	0.68	0.63	0.34	0.67	0.93	0.99	0.73
SNP	cg20510601 Intron 1	cg22675791 Intron 1	cg18568067 Intron 1	cg12087471 Intron 1	cg07092212 Intron 1	cg01132064 Intron 1	cg17266233 Intron 1	cg07121644 Intron 1	cg21770622 Intron 1	cg02865822 Intron 1	cg18337963 Intron 1
rs10838599	0.87	0.44	0.92	0.20	0.28	0.45	0.47	0.74	0.52	0.68	0.54
SNP	cg02211741 Intron 1	cg26473110 Intron 1	cg14787093 Intron 1	cg20204701 Intron 1	cg26963044 Intron 1	cg24713122 Intron 2	cg12856521 Exon 3	cg00107629 Intron 3	cg24126592 Intron 3	cg08768904 Exon 4	cg16769381 Exon 5
rs10838599	0.27	0.59	0.53	0.67	0.84	0.48	0.68	0.91	0.32	0.73	0.12
SNP	cg27651070 Intron 6	cg01529068 Intron 9	cg16977596 Intron 16	cg12927726 Exon 20	cg05897087 Intron 20	cg02154997 Exon 21	cg12592409 Intron 27	cg11436767 Exon 30	cg07052627 Exon 31	cg06266097 Exon 31 (3'-UTR)	cg11203377 Exon 31 (3'-UTR)
rs10838599	0.20	0.68	0.60	0.15	0.39	0.48	0.96	0.61	0.56	0.70	0.98

Boldface values represent statistically significant results ($P \leq 0.05$). P values for associations were obtained from a subset of 14 obese subjects (7 MetS+ and 7 MetS-). CpG sites positions according to genome build 37.

Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion

L'objectif principal de ce projet était de vérifier les associations entre les sites de polymorphismes de deux gènes candidats sélectionnés préalablement [9] et les complications métaboliques reliées à l'obésité. Les études d'association par la méthode des gènes candidats permettent de relier certains gènes à des processus spécifiques [20], ici étant celui du SMet. La variation génétique parmi les individus influence leur susceptibilité à certaines maladies et troubles de santé [291]. Il y a un très grand nombre de SNPs potentiellement associés avec le SMet, contribuant chacun à expliquer une fraction de la variabilité observée parmi les complications métaboliques reliées à l'obésité [203]. Les SNPs de *NMT1* et de *DGKZ* en font donc partie. Nous avons donc confirmé notre première hypothèse selon laquelle certains des différents SNPs de ces deux gènes candidats sont associés aux complications métaboliques de l'obésité. Ensuite, grâce à l'analyse de la méthylation des deux gènes et à la vérification des associations entre les niveaux de méthylation et les SNPs, nous avons pu vérifier notre deuxième hypothèse. Pour *NMT1*, le niveau de méthylation d'un site CpG était associé à un SNP et cette hypothèse a été confirmée. Par contre pour *DGKZ*, aucun site CpG n'était associé au seul SNP ayant un effet significatif et l'hypothèse a été infirmée. Finalement, la troisième hypothèse a été confirmée pour *NMT1* puisque la méthylation d'un site CpG était corrélée à l'expression de ce gène. Par contre pour *DGKZ*, cette hypothèse n'a pu être vérifiée vu l'infirmité de la seconde.

Malgré les rôles respectifs de *NMT1* et *DGKZ* dans le métabolisme des lipides, ils ont été très peu reliés au SMet et à l'obésité dans la littérature. Il a été tenté dans les articles présentés dans ce mémoire de relever des liens physiologiques potentiels pouvant expliquer la relation entre ces deux gènes candidats et le SMet ou ses composantes. D'abord pour *NMT1*, certains auteurs ont mentionné une interaction potentielle entre ce gène et l'insuline [292-294]. Vu que l'insuline est une hormone très importante et pouvant être impliquée de plusieurs manières dans le développement du SMet, *NMT1* pourrait également l'être. Également, la myristoylation est une modification protéique ayant la possibilité d'être impliquée de différentes manières dans des événements importants du développement du SMet. Ensuite pour *DGKZ*, son lien possible avec le SMet pourrait se faire par l'intermédiaire des seconds messagers DAG et PA. Dans le cas de chacun de ces deux gènes, ces liens restent hypothétiques et d'autres études sont évidemment nécessaires pour les démontrer.

Ce projet a donc permis d'établir les SNPs des gènes candidats *NMT1* et *DGKZ* comme ayant des effets significatifs sur les composantes du SMet en comparant leurs génotypes. Plus précisément, pour chacun des SNPs sélectionnés des deux gènes, les génotypes étaient comparés pour chaque composante analysée du SMet pour ainsi déterminer si l'allèle rare avait un effet protecteur ou délétère sur le phénotype. En résumé, les allèles rares des SNPs de *NMT1* significativement associés à une composante du SMet ont tous un effet protecteur, certains le sont en déduisant que l'allèle sauvage avait un effet délétère (rs2157840 et rs1005136). Le SNP de *DGKZ* ayant un effet significatif sur le taux de C-HDL avait également un effet protecteur.

Parmi les études s'intéressant à la génétique des MCV, les allèles communs sont souvent établis comme ayant des effets délétères de faible impact clinique en somme. Il faudrait pourtant les voir comme interagissant ensemble et avec les facteurs environnementaux pour comprendre leurs réelles conséquences [295]. De plus, pour permettre à ce type de projet d'apporter des conclusions cliniques utiles, il faudrait établir un consensus quant à la définition du SMet et de ses critères. En date d'aujourd'hui, plusieurs définitions du SMet sont utilisées et aucune n'est clairement établie comme meilleure que les autres [296]. Il en résulte entre autres que la proportion d'individus obèses varie entre 6 et 40%, dépendant de la définition utilisée [27-30, 33, 297-301].

Les résultats de ce projet doivent toutefois prendre en compte certaines limites. D'abord, les échantillons utilisés pour les analyses de méthylation et d'expression étaient relativement petits. Cependant, ces analyses constituaient des objectifs secondaires puisqu'elles servaient à mieux comprendre les mécanismes reliant la variation génétique à l'expression des phénotypes du SMet. Ensuite, l'analyse des TAV a été faite sur les échantillons entiers, c'est-à-dire que tous les types de cellules de ce tissu étaient inclus. Une évaluation sur les cellules adipeuses isolées aurait éliminé la possibilité que les différences dans la composition des tissus entre les individus affectent les résultats.

En conclusion, les deux articles présentés dans ce mémoire ont permis d'identifier de nouveaux sites de polymorphismes reliés au développement du SMet. Il s'agit d'un trouble de santé très complexe impliquant un grand nombre de gènes. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer plusieurs éléments discutés dans les deux articles présentés dans ce mémoire et pour refaire ces manipulations dans différentes cohortes. En effet, la prochaine étape d'un projet de ce type serait de répliquer les manipulations dans une

cohorte indépendante. Éventuellement, les conclusions des études du type de celles présentées dans ce mémoire serviront à identifier les individus plus à risque. Également, une meilleure connaissance de l'étiologie de l'obésité permettra de développer des médicaments plus spécifiques contre le développement des complications qui y sont associées. Cependant, il demeure que l'obésité est un problème sociétal qui est grandement influencé par l'environnement. Les recherches orientées vers une meilleure compréhension de son étiologie ont donc une grande possibilité de mener à estomper sa croissance, mais des changements au niveau du comportement doivent être inclus pour mener à une amélioration intégrale.

Bibliographie

1. Bégin S, G.F., Tchernof A, Deshaies Y, Pérusse L, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S and Vohl M-C, *Impact of NMT1 Gene Polymorphisms on Features of the Metabolic Syndrome among Severely Obese Patients*. Obesity Research Open Journal, 2015. **2**(4): p. 101-110.
2. Bégin S, G.F., Tchernof A, Deshaies Y, Pérusse L, Hould F-S, Lebel S, Marceau P and Vohl M-C., The rare allele of DGKZ SNP rs10838599 is associated with variability in HDL-cholesterol levels among severely obese patients. Integr Obesity Diabetes, 2016. **2**(3).
3. Albuquerque, D., et al., Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. Mol Genet Genomics, 2015.
4. Anis, A.H., et al., Obesity and overweight in Canada: an updated cost-of-illness study. Obes Rev, 2010. **11**(1): p. 31-40.
5. Luo, W., et al., The burden of adult obesity in Canada. Chronic Dis Can, 2007. **27**(4): p. 135-44.
6. Gotay, C.C., et al., Updating the Canadian obesity maps: an epidemic in progress. Can J Public Health, 2013. **104**(1): p. e64-8.
7. Hoffman, E.L., T. VonWald, and K. Hansen, *The metabolic syndrome*. S D Med, 2015. **Spec No**: p. 24-8.
8. Hamer, M. and E. Stamatakis, Metabolically healthy obesity and risk of all-cause and cardiovascular disease mortality. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(7): p. 2482-8.
9. Bouchard, L., et al., ZFP36: a promising candidate gene for obesity-related metabolic complications identified by converging genomics. Obes Surg, 2007. **17**(3): p. 372-82.
10. Guenard, F., et al., Differential methylation in visceral adipose tissue of obese men discordant for metabolic disturbances. Physiol Genomics, 2014. **46**(6): p. 216-22.
11. Turcot, V., et al., Comparison of the dipeptidyl peptidase-4 gene methylation levels between severely obese subjects with and without the metabolic syndrome. Diabetol Metab Syndr, 2013. **5**(1): p. 4.
12. Towler, D.A., et al., Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 2708-12.
13. Johnson, D.R., et al., Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 869-914.
14. Cai, J., et al., Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(9): p. 942-8.
15. Rincon, E., et al., Diacylglycerol kinase zeta: at the crossroads of lipid signaling and protein complex organization. Prog Lipid Res, 2012. **51**(1): p. 1-10.
16. Expert Panel on Detection, E.a.T.o.H.B.C.A., Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol Adults (Adult Treatment Panel III). in Journal of the American Medical Association. 2001. p. 2486.
17. Lakka, H.M., et al., The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. JAMA, 2002. **288**(21): p. 2709-16.
18. Ford, E.S., et al., Metabolic syndrome and risk of incident diabetes: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study. Cardiovasc Diabetol, 2008. **7**: p. 35.
19. Agarwal, S., et al., The association of chronic kidney disease and metabolic syndrome with incident cardiovascular events: multiethnic study of atherosclerosis. Cardiol Res Pract, 2012. **2012**: p. 806102.
20. Stancakova, A. and M. Laakso, *Genetics of metabolic syndrome*. Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(4): p. 243-52.

21. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
22. Alberti, K.G., et al., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
23. Chaudhary, N., et al., Epigenetic manifestation of metabolic syndrome and dietary management. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(2): p. 254-81.
24. Gallagher, E.J., D. Leroith, and E. Karnieli, Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. Mt Sinai J Med, 2010. **77**(5): p. 511-23.
25. Cheal, K.L., et al., Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel III diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1195-200.
26. Meigs, J.B., et al., Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. Diabetes Care, 2007. **30**(5): p. 1219-25.
27. Wildman, R.P., et al., The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). Arch Intern Med, 2008. **168**(15): p. 1617-24.
28. Aguilar-Salinas, C.A., et al., High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 4075-9.
29. Karelis, A.D., M. Brochu, and R. Rabasa-Lhoret, Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? Diabetes Metab, 2004. **30**(6): p. 569-72.
30. Meigs, J.B., et al., Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(8): p. 2906-12.
31. Phillips, C.M., Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. Rev Endocr Metab Disord, 2013. **14**(3): p. 219-27.
32. Karelis, A.D. and R. Rabasa-Lhoret, Inclusion of C-reactive protein in the identification of metabolically healthy but obese (MHO) individuals. Diabetes Metab, 2008. **34**(2): p. 183-4.
33. Stefan, N., et al., Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. Arch Intern Med, 2008. **168**(15): p. 1609-16.
34. O'Connell, J., et al., Preadipocyte factor-1 is associated with metabolic profile in severe obesity. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. E680-4.
35. Morkedal, B., et al., Risk of myocardial infarction and heart failure among metabolically healthy but obese individuals: HUNT (Nord-Trondelag Health Study), Norway. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(11): p. 1071-8.
36. Soriquer, F., et al., Metabolically healthy but obese, a matter of time? Findings from the prospective Pizarra study. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(6): p. 2318-25.
37. Wildman, R.P., *Healthy obesity*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(4): p. 438-43.
38. Achilike, I., et al., Predicting the development of the metabolically healthy obese phenotype. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(2): p. 228-34.
39. Bluher, M., Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013. **27**(2): p. 163-77.
40. O'Rahilly, S., Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. Nature, 2009. **462**(7271): p. 307-14.
41. Chung, W.K. and R.L. Leibel, Considerations regarding the genetics of obesity. Obesity (Silver Spring), 2008. **16 Suppl 3**: p. S33-9.

42. Blackett, P.R. and D.K. Sanghera, Genetic determinants of cardiometabolic risk: a proposed model for phenotype association and interaction. *J Clin Lipidol*, 2013. **7**(1): p. 65-81.
43. Hypertension in Diabetes Study (HDS): I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. *J Hypertens*, 1993. **11**(3): p. 309-17.
44. Chang, L. and J. Neu, Early factors leading to later obesity: interactions of the microbiome, epigenome, and nutrition. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2015. **45**(5): p. 134-42.
45. Milagro, F.I., et al., Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(4): p. 782-812.
46. Freedman, D.S., et al., The relation of obesity throughout life to carotid intima-media thickness in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28**(1): p. 159-66.
47. Povel, C.M., et al., Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev*, 2011. **12**(11): p. 952-67.
48. Drew, B.G., et al., The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 2012. **8**(4): p. 237-45.
49. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
50. Hegsted, D.M., et al., Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. *Am J Clin Nutr*, 1993. **57**(6): p. 875-83.
51. Morino, K., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*, 2006. **55 Suppl 2**: p. S9-S15.
52. Kaur, J., A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*, 2014. **2014**: p. 943162.
53. Bhunia, R.K., et al., Seed-specific increased expression of 2S albumin promoter of sesame qualifies it as a useful genetic tool for fatty acid metabolic engineering and related transgenic intervention in sesame and other oil seed crops. *Plant Mol Biol*, 2014. **86**(4-5): p. 351-65.
54. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res*, 2005. **36**(3): p. 232-40.
55. Rader, D.J. and A.R. Tall, The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nat Med*, 2012. **18**(9): p. 1344-6.
56. Rader, D.J. and G.K. Hovingh, *HDL and cardiovascular disease*. *Lancet*, 2014. **384**(9943): p. 618-25.
57. von Eckardstein, A., J.R. Nofer, and G. Assmann, High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(1): p. 13-27.
58. Annema, W. and A. von Eckardstein, High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ J*, 2013. **77**(10): p. 2432-48.
59. Leanca, C.C., et al., Metabolism of plasma cholesterol and lipoprotein parameters are related to a higher degree of insulin sensitivity in high HDL-C healthy normal weight subjects. *Cardiovasc Diabetol*, 2013. **12**: p. 173.
60. Tong, X., et al., High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin I-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Cardiovasc Diabetol*, 2013. **12**: p. 27.
61. Toth, P.P., et al., High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*, 2013. **7**(5): p. 484-525.
62. Goode, E.L., et al., Heritability of longitudinal measures of body mass index and lipid and lipoprotein levels in aging twins. *Twin Res Hum Genet*, 2007. **10**(5): p. 703-11.

63. Golay, A., et al., High density lipoprotein (HDL) metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus: measurement of HDL turnover using tritiated HDL. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987. **65**(3): p. 512-8.
64. Golay, A., et al., Role of insulin in regulation of high density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*, 1987. **28**(1): p. 10-8.
65. Vollenweider, P., A. von Eckardstein, and C. Widmann, *HDLs, diabetes, and metabolic syndrome*. *Handb Exp Pharmacol*, 2015. **224**: p. 405-21.
66. von Eckardstein, A. and R.A. Sibling, Possible contributions of lipoproteins and cholesterol to the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. *Curr Opin Lipidol*, 2011. **22**(1): p. 26-32.
67. Li, N., et al., Are hypertriglyceridemia and low HDL causal factors in the development of insulin resistance? *Atherosclerosis*, 2014. **233**(1): p. 130-8.
68. Klein, R.A., D. Halliday, and P.G. Pittet, The use of 13-methyltetradecanoic acid as an indicator of adipose tissue turnover. *Lipids*, 1980. **15**(8): p. 572-9.
69. Wu, L. and K.G. Parhofer, *Diabetic dyslipidemia*. *Metabolism*, 2014. **63**(12): p. 1469-79.
70. Arner, P., et al., Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature*, 2011. **478**(7367): p. 110-3.
71. Miller, M., et al., Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2011. **123**(20): p. 2292-333.
72. Chapman, M.J., et al., Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J*, 2011. **32**(11): p. 1345-61.
73. Leiter, L.A., et al., Persistent lipid abnormalities in statin-treated patients with diabetes mellitus in Europe and Canada: results of the Dyslipidaemia International Study. *Diabet Med*, 2011. **28**(11): p. 1343-51.
74. Johansen, C.T., S. Kathiresan, and R.A. Hegele, *Genetic determinants of plasma triglycerides*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(2): p. 189-206.
75. Johansen, C.T. and R.A. Hegele, The complex genetic basis of plasma triglycerides. *Curr Atheroscler Rep*, 2012. **14**(3): p. 227-34.
76. Ogedegbe, H.O. and D.W. Brown, The ubiquitous lipids and related diseases: a laboratory perspective. *MLO Med Lab Obs*, 2001. **33**(7): p. 18-24, 26; quiz 28-9.
77. Nordestgaard, B.G. and A. Varbo, Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*, 2014. **384**(9943): p. 626-35.
78. Tenenbaum, A., R. Klempfner, and E.Z. Fisman, Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Diabetol*, 2014. **13**: p. 159.
79. Patsch, J.R., et al., Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. *Studies in the postprandial state. Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(11): p. 1336-45.
80. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972. **18**(6): p. 499-502.
81. Tiyyagura, S.R. and D.A. Smith, *Standard lipid profile*. *Clin Lab Med*, 2006. **26**(4): p. 707-32.
82. Cholesterol Treatment Trialists, C., et al., The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*, 2012. **380**(9841): p. 581-90.
83. Patel, T.P., et al., Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev*, 2016. **21**(1): p. 11-23.
84. Cefalu, W.T., *Insulin resistance: cellular and clinical concepts*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2001. **226**(1): p. 13-26.
85. Pasquier, J., et al., Epigenetics and Cardiovascular Disease in Diabetes. *Curr Diab Rep*, 2015. **15**(12): p. 108.

86. Ceriello, A., New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 2003. **26**(5): p. 1589-96.
87. Ceriello, A., Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 1-7.
88. Brownlee, M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
89. Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
90. Rodrigues, T.C., et al., Hypertension is the metabolic syndrome component most strongly associated with microvascular complications and coronary artery calcification in Type 1 diabetes. *J Endocrinol Invest*, 2011. **34**(3): p. e58-63.
91. Roger, V.L., et al., Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2011. **123**(4): p. e18-e209.
92. Landsberg, L., et al., Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment--a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. **21**(1): p. 8-24.
93. Lu, M., et al., Prospective study of body size and risk for stroke amongst women below age 60. *J Intern Med*, 2006. **260**(5): p. 442-50.
94. Cox, K.L., et al., Exercise and weight control in sedentary overweight men: effects on clinic and ambulatory blood pressure. *J Hypertens*, 1996. **14**(6): p. 779-90.
95. Staessen, J.A., et al., *Essential hypertension*. *Lancet*, 2003. **361**(9369): p. 1629-41.
96. Ferrannini, E., et al., Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*, 1987. **317**(6): p. 350-7.
97. Shen, D.C., et al., Resistance to insulin-stimulated-glucose uptake in patients with hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988. **66**(3): p. 580-3.
98. Malhotra, A., et al., Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes*, 2001. **50**(8): p. 1918-26.
99. OMS. *Maladies Cardiovasculaires*. 2015; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>.
100. Badimon, L. and G. Vilahur, LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1254**: p. 18-32.
101. Nikolopoulou, A. and N.P. Kadoglou, Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2012. **10**(7): p. 933-9.
102. Badimon, L., et al., Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Mol Med*, 2006. **6**(5): p. 439-56.
103. Laslett, L.J., et al., The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(25 Suppl): p. S1-49.
104. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
105. Frostegard, J., Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med*, 2013. **11**: p. 117.
106. Gustafson, B., Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 2010. **17**(4): p. 332-41.
107. Chowdhury, B., et al., A multicompartiment body composition technique based on computerized tomography. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1994. **18**(4): p. 219-34.
108. Wajchenberg, B.L., Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 2000. **21**(6): p. 697-738.
109. Lau, D.C., et al., Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(5): p. H2031-41.

110. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 875-80.
111. Trayhurn, P. and I.S. Wood, Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 2004. **92**(3): p. 347-55.
112. Compher, C. and K.O. Badellino, Obesity and inflammation: lessons from bariatric surgery. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2008. **32**(6): p. 645-7.
113. Turer, A.T., et al., Adipose tissue biology and cardiomyopathy: translational implications. *Circ Res*, 2012. **111**(12): p. 1565-77.
114. Hotamisligil, G.S., Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
115. Kern, P.A., Potential role of TNFalpha and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr*, 1997. **127**(9): p. 1917S-1922S.
116. Langin, D., et al., Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*, 2005. **54**(11): p. 3190-7.
117. Bugianesi, E., A.J. McCullough, and G. Marchesini, Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 2005. **42**(5): p. 987-1000.
118. Lehr, S., S. Hartwig, and H. Sell, Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*, 2012. **6**(1-2): p. 91-101.
119. Xu, H., et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
120. Rabe, K., et al., Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*, 2008. **14**(11-12): p. 741-51.
121. Gulcelik, N.E., A. Usman, and A. Gurlek, Role of adipocytokines in predicting the development of diabetes and its late complications. *Endocrine*, 2009. **36**(3): p. 397-403.
122. Kadowaki, T., et al., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1784-92.
123. Dunmore, S.J. and J.E. Brown, The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 2013. **216**(1): p. T37-45.
124. Bjorntorp, P., Sjostrom L,+SJOSTROM L: Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. *Metabolism*, 1971. **20**(7): p. 703-13.
125. Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, and P.E. Scherer, *The adipocyte as an endocrine cell*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008. **37**(3): p. 753-68, x-xi.
126. Cinti, S., et al., Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 2005. **46**(11): p. 2347-55.
127. Krotkiewski, M., et al., Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*, 1983. **72**(3): p. 1150-62.
128. Spalding, K.L., et al., Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
129. Weyer, C., et al., Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, 2000. **43**(12): p. 1498-506.
130. Sopasakis, V.R., et al., High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res*, 2004. **12**(3): p. 454-60.
131. Hoffstedt, J., et al., Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia*, 2010. **53**(12): p. 2496-503.
132. Kloting, N., et al., *Insulin-sensitive obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **299**(3): p. E506-15.
133. Bluher, M., Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J*, 2012. **36**(5): p. 317-27.
134. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Leptin*. *Annu Rev Physiol*, 2000. **62**: p. 413-37.
135. Jacobs, M., et al., Low-grade inflammation can partly explain the association between the metabolic syndrome and either coronary artery disease or severity of peripheral arterial disease: the CODAM study. *Eur J Clin Invest*, 2009. **39**(6): p. 437-44.

136. Saleem, U., et al., Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(7): p. 2558-64.
137. Tsimikas, S., et al., Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J*, 2009. **30**(1): p. 107-15.
138. Zhang, Y., et al., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
139. Hutley, L. and J.B. Prins, Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*, 2005. **330**(6): p. 280-9.
140. Haynes, W.G., et al., Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*, 1997. **100**(2): p. 270-8.
141. Kennedy, A., et al., The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(4): p. 1293-300.
142. Carlyle, M., et al., Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension*, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 496-501.
143. Lee, Y.H., et al., Effects of leptin and adiponectin on pancreatic beta-cell function. *Metabolism*, 2011. **60**(12): p. 1664-72.
144. Yamagishi, S.I., et al., Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 25096-100.
145. Cote, M., et al., Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(3): p. 1434-9.
146. Arita, Y., et al., Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **257**(1): p. 79-83.
147. Kazumi, T., et al., Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care*, 2002. **25**(6): p. 971-6.
148. Fasshauer, M., et al., Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **290**(3): p. 1084-9.
149. Turer, A.T. and P.E. Scherer, Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*, 2012. **55**(9): p. 2319-26.
150. Hotta, K., et al., Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(6): p. 1595-9.
151. Liu, M. and F. Liu, Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J*, 2010. **425**(1): p. 41-52.
152. Matsuda, M., et al., Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37487-91.
153. Matsuzawa, Y., et al., *Adiponectin and metabolic syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(1): p. 29-33.
154. Hopkins, T.A., et al., Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(1): p. 11-8.
155. Pischon, T., et al., Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
156. Schulze, M.B., et al., Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004. **27**(7): p. 1680-7.
157. Marcelin, G. and S. Chua, Jr., Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. **10**(5): p. 588-93.

158. Carpentier, A., et al., Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2000. **49**(3): p. 399-408.
159. Sharma, S., et al., Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J*, 2004. **18**(14): p. 1692-700.
160. Kloting, N. and M. Bluher, Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, 2014. **15**(4): p. 277-87.
161. Serhan, C.N., et al., Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*, 2007. **21**(2): p. 325-32.
162. Flock, M.R., M.H. Green, and P.M. Kris-Etherton, Effects of adiposity on plasma lipid response to reductions in dietary saturated fatty acids and cholesterol. *Adv Nutr*, 2011. **2**(3): p. 261-74.
163. Skurk, T., et al., Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
164. Wannamethee, S.G., et al., Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 2005. **26**(17): p. 1765-73.
165. Ackermann, D., et al., Waist circumference is positively correlated with markers of inflammation and negatively with adiponectin in women with metabolic syndrome. *Nutr Res*, 2011. **31**(3): p. 197-204.
166. Blaha, M.J., et al., Association between obesity, high-sensitivity C-reactive protein ≥ 2 mg/L, and subclinical atherosclerosis: implications of JUPITER from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(6): p. 1430-8.
167. Nilsson, E., et al., Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2014. **63**(9): p. 2962-76.
168. Xydakis, A.M., et al., Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2697-703.
169. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
170. Kern, P.A., et al., Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **280**(5): p. E745-51.
171. Hotamisligil, G.S., et al., IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 1996. **271**(5249): p. 665-8.
172. Hotamisligil, G.S., et al., Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 1995. **95**(5): p. 2409-15.
173. Cartier, A., et al., Visceral obesity and plasma glucose-insulin homeostasis: contributions of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(5): p. 1931-8.
174. Pedersen, B.K., et al., Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil*, 2003. **24**(2-3): p. 113-9.
175. Stenlof, K., et al., Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(9): p. 4379-83.
176. Klover, P.J., A.H. Clementi, and R.A. Mooney, Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*, 2005. **146**(8): p. 3417-27.
177. Pradhan, A.D., et al., C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 2001. **286**(3): p. 327-34.

178. Zuliani, G., et al., High interleukin-6 plasma levels are associated with low HDL-C levels in community-dwelling older adults: the InChianti study. *Atherosclerosis*, 2007. **192**(2): p. 384-90.
179. Diamant, M., et al., The association between abdominal visceral fat and carotid stiffness is mediated by circulating inflammatory markers in uncomplicated type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(3): p. 1495-501.
180. Kushner, I., D. Rzewnicki, and D. Samols, What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med*, 2006. **119**(2): p. 166 e17-28.
181. Elliott, P., et al., Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. *JAMA*, 2009. **302**(1): p. 37-48.
182. Enquobahrie, D.A., et al., IL1B genetic variation and plasma C-reactive protein level among young adults: the CARDIA study. *Atherosclerosis*, 2009. **202**(2): p. 513-20.
183. Clearfield, M.B., C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease. *J Am Osteopath Assoc*, 2005. **105**(9): p. 409-16.
184. Lemieux, I., et al., Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(6): p. 961-7.
185. Deepa, R., et al., Serum levels of interleukin 6, C-reactive protein, vascular cell adhesion molecule 1, and monocyte chemotactic protein 1 in relation to insulin resistance and glucose intolerance--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Metabolism*, 2006. **55**(9): p. 1232-8.
186. Gonzalez, A.S., et al., Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. *Eur J Clin Nutr*, 2006. **60**(6): p. 802-9.
187. Guldiken, S., et al., The levels of circulating markers of atherosclerosis and inflammation in subjects with different degrees of body mass index: Soluble CD40 ligand and high-sensitivity C-reactive protein. *Thromb Res*, 2007. **119**(1): p. 79-84.
188. McLaughlin, T., et al., Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. *Circulation*, 2002. **106**(23): p. 2908-12.
189. Zacho, J., et al., Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. *N Engl J Med*, 2008. **359**(18): p. 1897-908.
190. Miura, T., C-reactive protein (CRP) is not a mere marker, but an active pathogenic substance. *Circ J*, 2011. **75**(7): p. 1579-80.
191. Faucher, G., et al., Genetic contribution to C-reactive protein levels in severe obesity. *Mol Genet Metab*, 2012. **105**(3): p. 494-501.
192. Vereshchagina, N., et al., The protein phosphatase PP2A-B' subunit Widerborst is a negative regulator of cytoplasmic activated Akt and lipid metabolism in *Drosophila*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 20): p. 3383-92.
193. Cantley, L.C., The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
194. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(7): p. 489-501.
195. Jensen, M.D., et al., Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes*, 1989. **38**(12): p. 1595-601.
196. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 175-84.
197. Education, N. *Gene Expression*. Scitable 2014; Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669>.
198. Joy, T., et al., Genetics of metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*, 2008. **8**(2): p. 141-8.
199. Farooqi, I.S. and S. O'Rahilly, *Genetic factors in human obesity*. *Obes Rev*, 2007. **8 Suppl 1**: p. 37-40.
200. Loos, R.J. and C. Bouchard, Obesity--is it a genetic disorder? *J Intern Med*, 2003. **254**(5): p. 401-25.

201. Basic, M., et al., Obesity: genome and environment interactions. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2012. **63**(3): p. 395-405.
202. Stunkard, A.J., et al., An adoption study of human obesity. *N Engl J Med*, 1986. **314**(4): p. 193-8.
203. Llewellyn, C. and J. Wardle, Behavioral susceptibility to obesity: Gene-environment interplay in the development of weight. *Physiol Behav*, 2015.
204. Agurs-Collins, T. and C. Bouchard, Gene-nutrition and gene-physical activity interactions in the etiology of obesity. Introduction. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. **16 Suppl 3**: p. S2-4.
205. Carmelli, D., L.R. Cardon, and R. Fabsitz, Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments? *Am J Hum Genet*, 1994. **55**(3): p. 566-73.
206. Hainer, V., et al., Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. **24**(8): p. 1051-7.
207. Dubois, L., et al., Genetic and environmental contributions to weight, height, and BMI from birth to 19 years of age: an international study of over 12,000 twin pairs. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e30153.
208. Chandalia, M., et al., Ethnic differences in the frequency of ENPP1/PC1 121Q genetic variant in the Dallas Heart Study cohort. *J Diabetes Complications*, 2007. **21**(3): p. 143-8.
209. Lin, H.F., et al., Heritabilities of the metabolic syndrome and its components in the Northern Manhattan Family Study. *Diabetologia*, 2005. **48**(10): p. 2006-12.
210. Lim, S.Y., et al., Factors Associated with Insulin Resistance in a Middle-Aged Non-Obese Rural Population: The Chungju Metabolic Disease Cohort (CMC) Study. *Epidemiol Health*, 2011. **33**: p. e2011009.
211. Musso, C., et al., Cardiometabolic risk factors as apolipoprotein B, triglyceride/HDL-cholesterol ratio and C-reactive protein, in adolescents with and without obesity: cross-sectional study in middle class suburban children. *Pediatr Diabetes*, 2011. **12**(3 Pt 2): p. 229-34.
212. Perusse, L. and C. Bouchard, *Gene-diet interactions in obesity*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **72**(5 Suppl): p. 1285S-1290S.
213. Masson, L.F., G. McNeill, and A. Avenell, Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr*, 2003. **77**(5): p. 1098-111.
214. Neel, J.V., The "thrifty genotype" in 1998. *Nutr Rev*, 1999. **57**(5 Pt 2): p. S2-9.
215. Andreassi, M.G., Metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis: influence of gene-environment interaction. *Mutat Res*, 2009. **667**(1-2): p. 35-43.
216. Andreassi, M.G., DNA damage, vascular senescence and atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(9): p. 1033-43.
217. Halliwell, B. and O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 1991. **281**(1-2): p. 9-19.
218. Marnett, L.J., Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 1999. **424**(1-2): p. 83-95.
219. Vera, E., et al., The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep*, 2012. **2**(4): p. 732-7.
220. Balasubramanyam, M., et al., Telomere shortening & metabolic/vascular diseases. *Indian J Med Res*, 2007. **125**(3): p. 441-50.
221. Blackburn, E.H., Telomere states and cell fates. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 53-6.
222. Adaikalakoteswari, A., et al., Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(1): p. 83-9.
223. Blasco, M.A., Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(8): p. 611-22.
224. Obana, N., et al., Telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in coronary disease patients with metabolic disorders. *Intern Med*, 2003. **42**(2): p. 150-3.

225. Basta, G., Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*, 2008. **196**(1): p. 9-21.
226. Shin, C.S., et al., Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care*, 2001. **24**(4): p. 733-7.
227. Andreassi, M.G., et al., Diabetes and chronic nitrate therapy as co-determinants of somatic DNA damage in patients with coronary artery disease. *J Mol Med (Berl)*, 2005. **83**(4): p. 279-86.
228. Andreassi, M.G., Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 2003. **543**(1): p. 67-86.
229. Martinet, W., et al., Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 927-32.
230. Mercer, J., M. Mahmoudi, and M. Bennett, DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutat Res*, 2007. **621**(1-2): p. 75-86.
231. De Flora, S. and A. Izzotti, Mutagenesis and cardiovascular diseases Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutat Res*, 2007. **621**(1-2): p. 5-17.
232. Kunieda, T., et al., Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation*, 2006. **114**(9): p. 953-60.
233. Matthews, C., et al., Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res*, 2006. **99**(2): p. 156-64.
234. Gorenne, I., et al., Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2006. **72**(1): p. 9-17.
235. Brouillette, S., et al., White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 842-6.
236. Olden, K., Genomics in environmental health research--opportunities and challenges. *Toxicology*, 2004. **198**(1-3): p. 19-24.
237. Miller, M.C., 3rd, H.W. Mohrenweiser, and D.A. Bell, Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett*, 2001. **120**(1-3): p. 269-80.
238. Little, M.P., et al., A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. *Radiat Res*, 2008. **169**(1): p. 99-109.
239. Loos, R.J., Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012. **26**(2): p. 211-26.
240. Rao, K.R., N. Lal, and N.V. Giridharan, Genetic & epigenetic approach to human obesity. *Indian J Med Res*, 2014. **140**(5): p. 589-603.
241. Gerken, T., et al., The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, 2007. **318**(5855): p. 1469-72.
242. Frayling, T.M., et al., A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 2007. **316**(5826): p. 889-94.
243. Dina, C., et al., Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*, 2007. **39**(6): p. 724-6.
244. Kamata, N., R.M. Jotte, and J.T. Holt, Myristylation alters DNA-binding activity and transactivation of FBR (gag-fos) protein. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(2): p. 765-72.
245. Sakane, F., et al., Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(7): p. 793-806.
246. Bouchard, L., et al., Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr*, 2010. **91**(2): p. 309-20.
247. Waterland, R.A., Does nutrition during infancy and early childhood contribute to later obesity via metabolic imprinting of epigenetic gene regulatory mechanisms? *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 2005. **56**: p. 157-71; discussion 171-4.

248. Laird, P.W. and R. Jaenisch, The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet*, 1996. **30**: p. 441-64.
249. Bird, A., Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
250. Bell, J.T., et al., DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol*, 2011. **12**(1): p. R10.
251. Wallace, D.C. and W. Fan, Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*, 2010. **10**(1): p. 12-31.
252. Waterland, R.A. and K.B. Michels, Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr*, 2007. **27**: p. 363-88.
253. Zhu, J.G., et al., Differential DNA methylation status between human preadipocytes and mature adipocytes. *Cell Biochem Biophys*, 2012. **63**(1): p. 1-15.
254. Chuang, J.C. and P.A. Jones, *Epigenetics and microRNAs*. *Pediatr Res*, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 24R-29R.
255. van Dijk, S.J., et al., Epigenetics and human obesity. *Int J Obes (Lond)*, 2015. **39**(1): p. 85-97.
256. Suzuki, H., et al., DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. *Pharmacogenomics*, 2008. **9**(12): p. 1917-28.
257. Reik, W., Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 425-32.
258. Bird, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002. **16**(1): p. 6-21.
259. Schubeler, D., et al., Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(24): p. 9103-12.
260. Jones, P.A., Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(7): p. 484-92.
261. Jacobsen, S.C., et al., Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, 2012. **55**(12): p. 3341-9.
262. Ronn, T., et al., A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet*, 2013. **9**(6): p. e1003572.
263. Jacobsen, S.C., et al., Young men with low birthweight exhibit decreased plasticity of genome-wide muscle DNA methylation by high-fat overfeeding. *Diabetologia*, 2014. **57**(6): p. 1154-8.
264. Wilson, A.G., Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol*, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1514-9.
265. Wang, D., et al., Individual variation and longitudinal pattern of genome-wide DNA methylation from birth to the first two years of life. *Epigenetics*, 2012. **7**(6): p. 594-605.
266. Feinberg, A.P., et al., Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(49): p. 49ra67.
267. Heyn, H., et al., DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res*, 2013. **23**(9): p. 1363-72.
268. K, R.A.a.S. *Gene Expression Regulates Cell Differentiation*. *Nature Education* 2008 [cited 1 1]; 127]. Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-regulates-cell-differentiation-931>.
269. Bird, A., The essentials of DNA methylation. *Cell*, 1992. **70**(1): p. 5-8.
270. Aad, G., et al., Search for a standard model Higgs boson in the H \rightarrow ZZ \rightarrow l(+)l(-)nunu decay channel with the ATLAS detector. *Phys Rev Lett*, 2011. **107**(22): p. 221802.
271. Huang, Q., Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era. *J Genet Genomics*, 2015. **42**(3): p. 87-98.
272. Robertson, K.D., DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(8): p. 597-610.

273. Wang, J., et al., Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **17**(2): p. 282-301.
274. Martinez, J.A., et al., Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. *Adv Nutr*, 2014. **5**(1): p. 71-81.
275. Ainge, H., et al., A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(3): p. 325-35.
276. Herrera, B.M., S. Keildson, and C.M. Lindgren, *Genetics and epigenetics of obesity*. *Maturitas*, 2011. **69**(1): p. 41-9.
277. Milagro, F.I., et al., High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem*, 2009. **65**(1): p. 1-9.
278. Plagemann, A., et al., Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 20): p. 4963-76.
279. Hosoki, K., et al., Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2008. **16**(8): p. 1019-23.
280. Whayne, T.F., Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease. *Mol Biol Rep*, 2015. **42**(4): p. 765-76.
281. Ingrosso, D., et al., Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet*, 2003. **361**(9370): p. 1693-9.
282. Ling, C., et al., Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia*, 2008. **51**(4): p. 615-22.
283. Melzner, I., et al., Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47): p. 45420-7.
284. Brons, C., et al., Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(6): p. 3048-56.
285. Milagro, F.I., et al., A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J*, 2011. **25**(4): p. 1378-89.
286. Barres, R., et al., Weight loss after gastric bypass surgery in human obesity remodels promoter methylation. *Cell Rep*, 2013. **3**(4): p. 1020-7.
287. Ge, K., Epigenetic regulation of adipogenesis by histone methylation. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1819**(7): p. 727-32.
288. Reinius, L.E., et al., Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41361.
289. Wu, H.C., et al., Global methylation profiles in DNA from different blood cell types. *Epigenetics*, 2011. **6**(1): p. 76-85.
290. Robitaille, J., et al., The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. *Clin Genet*, 2003. **63**(2): p. 109-16.
291. Doo, M. and Y. Kim, Obesity: interactions of genome and nutrients intake. *Prev Nutr Food Sci*, 2015. **20**(1): p. 1-7.
292. King, M.J., et al., Membrane-associated N-myristoyltransferase activity is reduced in obese (fa/fa) Zucker rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **196**(2): p. 665-70.
293. Hedo, J.A., E. Collier, and A. Watkinson, Myristyl and palmityl acylation of the insulin receptor. *J Biol Chem*, 1987. **262**(3): p. 954-7.
294. Sharma, R.K., Potential role of N-myristoyltransferase in pathogenic conditions. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004. **82**(10): p. 849-59.
295. Andreassi, M.G. and N. Botto, DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2003. **13**(7): p. 270-5.

296. Batsis, J.A., R.E. Nieto-Martinez, and F. Lopez-Jimenez, Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **82**(5): p. 509-24.
297. Ruderman, N.B., S.H. Schneider, and P. Berchtold, *The "metabolically-obese," normal-weight individual*. *Am J Clin Nutr*, 1981. **34**(8): p. 1617-21.
298. Messier, V., et al., Identifying metabolically healthy but obese individuals in sedentary postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. **18**(5): p. 911-7.
299. Pataky, Z., E. Bobbioni-Harsch, and A. Golay, *Open questions about metabolically normal obesity*. *Int J Obes (Lond)*, 2010. **34 Suppl 2**: p. S18-23.
300. Primeau, V., et al., Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(7): p. 971-81.
301. Shea, J.L., E.W. Randell, and G. Sun, The prevalence of metabolically healthy obese subjects defined by BMI and dual-energy X-ray absorptiometry. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(3): p. 624-30.