

JEAN-FRANCOIS MAUGER

**APOLIPOPROTÉINE C-III, TAILLE DES LDL ET
PROTÉINE C-RÉACTIVE**
Études physiologiques en relation avec le syndrome métabolique

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en nutrition
pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'ALIMENTATION ET DE L'AGRICULTURE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

© Jean-François Mauger, 2009

Résumé

Le syndrome métabolique est un regroupement de facteurs de risque de maladie cardiovasculaire (MCV) étroitement liés à l'obésité. L'hypertriglycéridémie, la présence en circulation de lipoprotéines de faible densité (LDL) de diamètre réduit et une condition pro-inflammatoire représentent trois de ces facteurs. L'apolipoprotéine (apo) C-III, présente sous 3 isoformes en circulation, inhibe la lipase lipoprotéique et serait impliquée dans le développement de l'hypertriglycéridémie. Les LDL petites et denses seraient métabolisées moins rapidement et seraient ainsi plus susceptibles de participer au processus athérosclérotique. Les concentrations plasmatiques élevées de protéine C-réactive (CRP) sont utilisées en clinique dans l'évaluation de la condition inflammatoire et dans l'estimation du profil de risque de MCV. La compréhension du métabolisme intravasculaire de l'apoC-III, des différentes classes de LDL et de la CRP en rapport avec le syndrome métabolique est incomplète. Utilisant des techniques de traçage in vivo, les mécanismes physiologiques (taux de production et de catabolisme) responsables des variations de concentrations plasmatiques des différents isoformes de l'apoC-III, de la CRP et des LDL petites et denses furent étudiés. Les études sur le métabolisme intravasculaire de l'apoC-III ont démontré que le taux de production de l'ensemble des isoformes de l'apoC-III était positivement associé aux concentrations plasmatiques de triglycérides et que le taux de production de l'isoforme doublement sialylée était fortement associé à la proportion de petites LDL en circulation. L'étude de la cinétique intravasculaire de différentes sous-classes de LDL a révélé que les LDL de moindres densités, malgré leur métabolisme intravasculaire rapide, sont les principaux précurseurs des LDL de plus hautes densités. Finalement, l'étude de la CRP révéla que les concentrations plasmatiques de ce marqueur inflammatoire sont déterminées principalement par son taux de production, et que ce dernier serait positivement associé au tour de taille et aux concentrations plasmatiques d'apoB-100 et de triglycérides, et négativement associé aux concentrations plasmatiques de lipoprotéines de haute densité et d'adiponectine. Dans l'ensemble, ces études in vivo auront permis de mieux situer le rôle métabolique des isoformes de l'apoC-III, des LDL et de la CRP dans le développement du syndrome métabolique et appellent à la réalisation d'études dans divers contextes métaboliques afin de valider les conclusions ici présentées.

Abstract

The metabolic syndrome, a cluster of cardiovascular disease (CVD) risk factors, was recently proposed to explain the increased CVD risk associated with obesity. Among those factors, hypertriglyceridemia, the predominance of small dense low-density lipoproteins (LDL) in circulation and the presence of a mild, chronic pro-inflammatory condition are thought to contribute significantly to the increased CVD risk observed among MS patients. ApoC-III displays three isoforms in circulation, is a potent inhibitor of lipoprotein lipase and has been closely linked to the development of the hypertriglyceridemic state. Some studies on small dense LDL have provided indirect evidence of their prolonged residence time in circulation, a factor that could increase their atherogenicity. Finally, C-reactive protein, a useful marker of chronic low-grade inflammation, is currently considered as a potent clinical tool in the assessment of global CVD risk. However, the intravascular metabolism of apoC-III isoforms, small dense LDL and CRP in relationship with the other metabolic syndrome components are poorly understood. Using stable isotope tracer methodologies, we investigate the physiological mechanisms (rate of production, transfer and catabolism) sustaining the circulating concentrations of each of these metabolic factors. Our study of the apoC-III isoform kinetics showed that the production rate of all apoC-III isoforms is positively associated with plasma triglyceride concentrations and that the production rate of the di-sialylated isoform is closely linked to the proportion of circulating small dense LDL. The kinetic study of different LDL density subclasses showed that large buoyant LDL are rapidly metabolised, but serve as the main metabolic precursor of the smaller, denser LDL counterpart. The study of CRP revealed that the production rate of this inflammatory marker is: 1) the main determinant of the circulating CRP concentrations; 2) positively associated with waist girth and plasma apoB-100 and triglyceride concentrations and 3) negatively associated with plasma high-density lipoproteins and adiponectin concentrations. Together, these studies provide relevant metabolic information that betters our understanding of the physiological processes associated with the metabolic syndrome. However, further metabolic studies in significantly more deteriorated individuals are warranted to validate the conclusions reported here.

Avant-Propos

Remerciements

Bon bon bon... que dois-je faire en premier? Commencé-je par écrire les remerciements, ou vais-je plutôt garder cette partie pour la toute fin? J'ai sûrement besoin d'un verre d'eau pour cogiter sur cette question.

...S'ensuivent plusieurs verres d'eau et plusieurs sessions de guitare (...The answer my friend, is blowin' in the wind...), d'entraînement, de dessin, plusieurs tournois de ultimate frisbee et plein d'autres activités n'ayant rien à voir avec la rédaction de cette thèse...

De retour devant l'ordinateur. J'ai finalement décidé de rédiger cette section à la toute fin. Voilà une bonne chose de réglée. Cela mérite bien un peu de repos.

...

L'histoire de la rédaction de cette thèse en est une d'apprentissage, de découvertes personnelles et d'introspection. Cette histoire est en parfait contraste avec les expériences personnelles que les recherches que je présente ici m'ont permis de vivre. Maintenant est venu le temps de dire merci à tous ceux qui m'ont accompagné et guidé, en personne et en pensées, au cours des 4 dernières années.

Le premier de ces remerciements va à mon superviseur, Benoît Lamarche, un homme dont les qualités sont si innombrables que je n'essaierai même pas d'en faire la liste par peur de le froisser en en oubliant trop. Je me permettrais quand même de souligner le fait que Benoît, en plus de ses aptitudes incroyables de chercheur, de directeur et d'athlète, a cette capacité difficile à décrire en mots (probablement en raison de mon vocabulaire restreint), de vous faire sentir bien et bon. S'il m'était permis d'acquérir une seule des qualités de Benoît, ce serait celle-là que je choisirais.

J'aimerais ensuite remercier le Dr Yves Deshaies, mon cosuperviseur, avec qui, par ma faute, j'ai malheureusement peu interagi au cours de mon doctorat. Le Dr Deshaies est une figure de proue de la recherche dans le domaine de l'obésité au Québec et souvent ai-je

entendu l'écho glorifier sa rigueur scientifique et sa sagesse. Cette phrase paraîtra clichée aux lecteurs, mais le Dr Deshaies demeurera pour moi un modèle d'intégrité scientifique et de fin connaisseur de la physiologie du métabolisme énergétique. J'espère seulement que l'avenir me donnera à nouveau la chance de profiter de son savoir et de ses connaissances.

Je tiens aussi à remercier le Dr Patrick Couture, pour les bons moments passés en congrès et pour ses critiques judicieuses et toujours minimalistes de nos articles scientifiques. Je tiens aussi à remercier les Dr André Tchernof et André Carpentier, qui ont accepté d'évaluer ma thèse et d'être mes bourreaux lorsque j'en ferai la soutenance.

Un merci spécial va à l'ensemble des gens qui composent l'équipe du laboratoire Lamarche. Plus particulièrement, j'aimerais remercier les vieux de la veille avec qui j'ai été initié aux joies et aux peines de la recherche : Marie-Eve Paradis, Isabelle Ruel, Mathieu Larivière, Jean-Charles Hogue et André Tremblay. Pour citer Brian Wilson des Beach Boys, « *God only knows where I'd be without you* ». Merci aussi à Johanne Marin et à Georges Cousineau. Les midis passés en votre compagnie à parler de tout et de rien et à refaire le monde sont pour moi des souvenirs que je vais longtemps chérir. Mes épaules se rappellent d'ailleurs encore le projet des LDL et les heures innombrables à « décanter » les tubes d'ultracentrifugations en compagnie de Georges. Enfin, je me dois d'adresser de gros remerciements à Amélie Charest, pour son aide incroyable dans la réalisation de l'étude des LDL, et à Josée Levesque, pour son travail incommensurable dans le projet de l'étude de la CRP.

Finalement, les derniers et non les moindres, une infinité de mercis à ma famille et à mes amis, pour faire de ma vie ce qu'elle est. Merci à mes parents de me laisser, bien contre leur gré, m'exiler là où mes aspirations me portent et de me soutenir dans les moments difficiles où il m'arrive de me demander « *Où c'est-ce que j'm'en vas?* ». Merci à mon frère, Frédéric, avec qui parler n'est même pas nécessaire pour « *qu'on s'comprenne* ». Merci à mon amoureuse, Marie-Andrée, de m'accompagner dans mes hauts et mes bas, et de faire en sorte que mes bas ne soient pas si bas que ça. Finalement, une dernière pensée pour mes amis, Simon et Jean-Sébastien, que je n'ai pas vus assez souvent au cours des dernières années. On a quelques bières de retard...

Contributions

Les travaux présentés ici ont nécessité la collaboration de plusieurs personnes. **Dr Benoît Lamarche**, mon superviseur, fut impliqué dans chacune des étapes qui ont mené à la rédaction des articles qui composent cette thèse, de la planification des projets jusqu'à l'analyse critique des conclusions ici présentées. Le **Dr Patrick Couture**, chercheur clinicien au Centre de recherche sur les maladies lipidiques du Centre hospitalier de l'Université Laval, était responsable du suivi médical des individus qui composaient les différentes cohortes étudiées. La **Dre Nathalie Bergeron**, anciennement du département de nutrition de l'Université Laval, était l'investigatrice principale du projet CHO, projet qui incluait une cohorte d'hommes ayant participé à des études de cinétique et dont les échantillons plasmatiques furent utilisés pour la réalisation des travaux présentés aux chapitres 5 et 7. La **Dre Marie-Eve Paradis** fut responsable de l'étude LEF et du recrutement de la cohorte de femmes chez qui la cinétique de la CRP fut examinée au chapitre 7. Le dosage des concentrations plasmatiques d'adiponectine fut effectué par le laboratoire du **Dr André Tchernof**. L'étudiante de maîtrise que j'ai eu la chance de superviser, **Josée Levesque**, m'a grandement aidé dans l'élaboration et l'optimisation des méthodes de purification de la CRP et dans la réalisation de l'étude qui compose le chapitre 7.

En tant que premier auteur sur l'ensemble des articles qui composent les chapitres 5, 6 et 7, j'ai été impliqué à tous les niveaux de ces projets, de la génération des données brutes à la soumission des articles aux revues scientifiques pour fins de publication. Pour l'étude du chapitre 6, j'ai servi de cobaye lors de l'étude pilote pour tester la faisabilité des études de cinétique sur 96 heures, j'ai participé à la supervision des études cinétiques et à la séparation des fractions lipoprotéiques par ultracentrifugation séquentielle. Pour l'ensemble des études des chapitres 5, 6 et 7, j'ai purifié les protéines étudiées et spécifiquement mis au point la méthode de purification de la CRP en compagnie de Josée Levesque. J'ai procédé aux analyses d'enrichissement isotopique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et élaboré les modèles pluricompartimentaux permettant d'extraire l'information cinétique des courbes

d'enrichissement générées. Enfin, j'ai réalisé les analyses statistiques et rédigé les premières versions des articles présentés ici sous la supervision de Benoît Lamarche.

*Je dédis mnvjfdippppp cette t;hl;lllllllllèse à
Gourille, mmmmbbbbm,, ma chattem
mrvvvvvvvvv qui marche
prééééééé...sentemt sur -o-0-0 mon clavier.*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Remerciements.....	iii
Contributions	v
Table des matières	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Introduction générale	1
Chapitre 1. Syndrome métabolique : facteur de risque émergent de la maladie cardiovasculaire	4
1.1 Définition et diagnostique clinique du syndrome	4
1.2 Prévalence du syndrome métabolique	6
1.3 Risque de MCV et diabète de type 2 associé au syndrome métabolique	7
1.4 Physiopathologie du syndrome métabolique	8
1.4.1 Obésité	9
1.4.2 Résistance à l'insuline	16
1.4.3 Dyslipidémie athérogène	18
1.4.4 Hypertension.....	20
1.5 Prévention et traitement du syndrome métabolique	22
1.5.1 Habitudes de vie.....	23
1.5.2 Agents pharmacologiques.....	24
Chapitre 2. Facteurs et concepts physiologiques connexes au syndrome métabolique : apolipoprotéine C-III, hétérogénéité des LDL et protéine C-réactive.....	26
2.1 Apolipoprotéine C-III	26
2.1.1 Physiologie.....	26
2.1.2 Rôle métabolique	27
2.1.3 ApoC-III et MCV.....	29
2.1.4 ApoC-III et syndrome métabolique	29
2.1.5 Facteurs influençant les concentrations plasmatiques d'apoC-III	31
2.1.6 Isoformes de l'apoC-III : origines et impact métabolique.....	31
2.2 Hétérogénéité des LDL	33
2.2.1 Structure et classes de lipoprotéines	33
2.2.3 LDL-cholestérol et MCV.....	34
2.2.4 Hétérogénéité des LDL et MCV	35
2.2.5 Hétérogénéité des LDL : origine métabolique.....	36

2.3 Protéine C-réactive	38
2.3.1 Physiologie de la CRP	38
2.3.2 CRP et MCV	39
2.3.3 CRP et syndrome métabolique	40
2.3.4 Hypothèse de l'implication directe de la CRP dans la pathophysiologie de la MCV	43
Chapitre 3. Cinétique des protéines	45
3.1 Traceurs	45
3.2 Méthodes de marquage	46
3.2.1 Marquage exogène	46
3.2.2 Marquage endogène	47
3.3 Méthode d'administration des traceurs	48
3.3.1 Impulsion	48
3.3.2 Infusion constante	49
3.3.3 Marquage endogène : Infusion constante vs impulsion	50
3.4 Analyse des études de cinétique	52
3.4.1 Modèles pluricompartimentaux	53
3.5 Cinétique de l'apoC-III	57
3.5.1 Études d'observation	57
3.5.2 Études d'intervention	59
3.6 Cinétique de différentes sous-classes de LDL	61
3.6.1 Cinétique de l'apoB-100 : généralités	62
3.6.2 Études d'observation dans le contexte de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète de type 2	63
3.6.3 Études d'intervention : perte de poids, nutrition et agents pharmacologiques	65
3.6.4 Cinétique de l'apoB-100 et hétérogénéité des LDL	66
3.7 Cinétique de la CRP	70
Chapitre 4. Problématique	72
4.1 Apolipoprotéine C-III	72
4.2 Hétérogénéité des LDL	73
4.3 Protéine C-réactive	73
Chapitre 5. Isoformes de l'apolipoprotéine C-III : cinétique et implication respective dans le métabolisme des lipoprotéines	75
Chapitre 6. Étude de la cinétique intravasculaire des LDL de différentes tailles chez l'humain	103
Chapitre 7. Cinétique intravasculaire de la protéine C-réactive chez l'humain en lien avec les facteurs de risque du syndrome métabolique	133
Chapitre 8. Conclusion	161
Bibliographie	167

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 :

Tableau 1.1: Algorithmes cliniques les plus cités du syndrome métabolique 5

CHAPITRE 5 :

Table 5.1: Characteristics of study subjects 98

Table 5.2: Plasma kinetics of each apoC-III isoform in the constantly fed state 99

Table 5.3: Spearman correlation coefficient between apoC-III isoform kinetics and apolipoprotein metabolism and lipid levels 100

CHAPITRE 6 :

Table 6.1: Characteristics of the 12 study participants 130

Table 6.2: LDL characteristics and apoB-100 kinetics within the 5 lipoprotein fractions in the sample of 12 men 131

Table 6.3: Absolute and relative apoB-100 fluxes within the three LDL subfractions 132

CHAPITRE 7 :

Table 7.1: Characteristics of study participants 154

Liste des figures

CHAPITRE 1 :

Figure 1.1 : Estimation de la prévalence du syndrome métabolique selon les critères de NCEP/ATP III.....6

Figure 1.2 : Résumé des anomalies métaboliques associées au syndrome métabolique22

CHAPITRE 2 :

Figure 2.1 : Relations entre les concentrations plasmatiques d'apoC-III et le risque de syndrome métabolique.30

Figure 2.2 : Risque relatif d'événement cardiovasculaire en lien avec les concentrations plasmatiques de LDL-cholestérol, d'apoB-100, de triglycérides et la proportion de LDL denses circulantes.35

Figure 2.3 : Risque d'événement coronarien en lien avec les concentrations plasmatiques de CRP et le syndrome métabolique.....42

CHAPITRE 3 :

Figure 3.1 : (A) Évolution de l'activité spécifique d'un traceur exogène et (B) de l'enrichissement isotopique au sein du pool de traceur/trace libre (pool précurseur) et d'un pool de produit suite à l'injection d'un bolus de traceur.49

Figure 3.2 : Évolution de l'enrichissement isotopique au sein du pool de traceur/trace libres (pool précurseur) et du pool d'un produit lors d'une infusion constante de traceur.....50

Figure 3.3 : Exemple de modèle pluricompartimental simple pour la description du métabolisme de l'apoB-100.....53

Figure 3.4 : Exemples de modèles pluricompartimentaux complexes pour la description du métabolisme de l'apoB-100.....63

CHAPITRE 5 :

Figure 5.1 : Modeled enrichment curves of the 3 apoC-III isoforms with deuterated leucine during the 12 hour constant infusion. 101

Figure 5.2 : Relation between the production rate (PR) of each apoC-III isoform and LDL peak particle size..... 102

CHAPITRE 6 :

Figure 6.1 : Schematic representation of the multicompartmental model used in the present study. 127

Figure 6.2 : Measured and model-predicted apoB-100 enrichment data over time obtained for the three LDL subclasses. 128

Figure 6.3 : Pooled data analysis of the relationship between LDL particle diameter and the FCR of apoB-100 in all LDL fractions combined. 129

CHAPITRE 7 :

Figure 7.1 : Difference in CRP kinetic between men (n=15) and women (n=16)..... 156

Figure 7.2 : Mean production rate of CRP (top panel) and fractional catabolic rate of CRP (bottom panel) among subjects grouped according to proposed CRP cut-off values for CVD risk management. 157

Figure 7.3 : Relationship between the production rate of CRP and waist girth in men and women..... 158

Figure 7.4 : Relationship between CRP kinetic and the number of metabolic syndrome-related features in men and women. 159

Figure 7.5 : Production rate (top panel) of CRP and fractional catabolic rate (lower panel) of CRP with increasing number of features of the metabolic syndrome. 160

Introduction générale

Selon l'Organisation mondiale de la santé, la maladie cardiovasculaire (MCV) constitue la première cause mondiale de décès. Bien que le taux de mortalité attribuable à la MCV soit en constante régression dans la plupart des pays industrialisés depuis près de 30 ans (1, 2) en raison de la prise en charge agressive de l'hypertension, de l'hypercholestérolémie et du tabagisme, cette tendance apparaît comme la résultante de deux forces diamétralement opposées. D'une part, les avancées médicales ont permis de réduire la fréquence des événements cliniques de MCV et d'améliorer le taux de survie suite aux événements coronariens. D'autre part, l'adoption d'un style de vie sédentaire et d'une alimentation dense en énergie a fait en sorte que le nombre de décès attribuables à l'obésité et à sa complication métabolique majeure, le diabète de type 2, a connu une progression constante au cours des 20 dernières années (1, 2). De plus, l'obésité et le diabète de type 2 sont significativement responsables de l'augmentation du nombre de décès reliés à la MCV observée chez les populations des pays en voie d'industrialisation (3, 4). Ainsi, la progression de l'obésité et du diabète de type 2, qui ont tous deux atteint des proportions pandémiques dans toutes les strates d'âge (5), laisse présager une recrudescence du taux de mortalité attribuable à la MCV au cours des prochaines années (5, 6).

L'athérosclérose, qui consiste en l'occlusion progressive de la lumière artérielle par le développement de la plaque athéromateuse, est la cause la plus fréquente des manifestations cliniques de MCV. La plaque athéromateuse se définit comme une agglomération au niveau de la paroi vasculaire composée d'un noyau nécrosé riche en lipides (cholestérol et phospholipides) et en cellules immunitaires (monocytes, macrophages et lymphocytes-T), recouvert de tissu fibreux, de cellules musculaires lisses et de tissu conjonctif (7). La rupture éventuelle de la plaque et la formation d'un caillot occlusif mène à l'événement thrombotique pouvant causer l'ischémie, qui elle est susceptible d'entraîner l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral.

Actuellement, l'initiation de stratégies visant à freiner le processus athérosclérotique et prévenir ses conséquences cliniques repose sur l'estimation du risque individuel de MCV par la considération d'un ensemble de facteurs de risque traditionnels. L'histoire familiale de MCV, le sexe, l'âge, les concentrations plasmatiques de cholestérol associé aux

lipoprotéines de faible densité (*low density lipoproteins*, LDL, athérogéniques) et aux lipoprotéines de haute densité (*high density lipoproteins*, HDL, athéroprotectives), la pression artérielle, le tabagisme, le surpoids, la sédentarité et le diabète constituent les principaux facteurs qui composent les algorithmes actuels de prédiction du risque de MCV utilisés en clinique.

Le cholestérol plasmatique, et plus particulièrement le cholestérol associé aux LDL (LDL-C), est probablement le facteur de risque modifiable le plus étroitement surveillé (8), principalement en raison de son rôle essentiel dans le processus athérosclérotique. Toutefois, l'augmentation substantielle des concentrations plasmatiques de LDL-C ne fait pas partie des anomalies métaboliques fréquemment observées dans le contexte de l'obésité et du diabète de type 2. Ceci suggère que le risque élevé de MCV associé à ces conditions métaboliques pourrait en partie être dû à divers facteurs physiologiques capables d'augmenter le potentiel athérogénique de concentrations plasmatiques relativement normales de cholestérol LDL. La prévalence croissante de l'obésité et de ses complications crée donc un besoin urgent d'améliorer la compréhension des désordres physiologiques à l'origine du risque accru de MCV associé à l'obésité.

Les travaux qui composent la présente thèse gravitent autour du syndrome métabolique, un regroupement de désordres physiologiques intimement associés à l'obésité. Ce concept récent a grandement attiré l'intérêt scientifique au cours de la dernière décennie pour son potentiel clinique à cibler une fraction de la population à haut risque de MCV et de diabète de type 2. La présente thèse se divise en 8 chapitres :

Le premier chapitre présente le syndrome métabolique comme facteur de risque émergent de la MCV et comme outil clinique d'estimation du risque de MCV et de diabète de type 2. Ce chapitre décrit le syndrome métabolique ainsi que les principaux algorithmes cliniques utilisés pour son diagnostic. Une revue des principales composantes du syndrome et de la contribution de chacune de ces composantes dans l'étiologie du syndrome y est présentée. Finalement, un bref aperçu de la prévalence du syndrome métabolique est donné et quelques unes des avenues thérapeutiques présentement envisagées dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique sont exposées.

Le deuxième chapitre présente les différents facteurs et concepts physiologiques qui ont été approfondis au cours des travaux qui composent la présente thèse, soient l'apolipoprotéine (apo) C-III, l'hétérogénéité des LDL et la protéine C-réactive (CRP), et situe ceux-ci dans le cadre du syndrome métabolique.

Le troisième chapitre se divise en deux parties. La première partie explique les principes de l'étude de la cinétique des protéines, méthodologie qui est à la base de la totalité des travaux présentés ici. La seconde partie résume les études cinétiques s'étant attardées au métabolisme in vivo de l'apoC-III, des LDL et de la CRP.

Le quatrième chapitre décrit la problématique qui a mené à la réalisation des travaux présentés dans les chapitres subséquents.

Le cinquième chapitre est composé d'un article scientifique intitulé *Apolipoprotein C-III isoforms: kinetics and relative implication in lipid metabolism* paru dans la revue *Journal of Lipid Research* en 2006.

Le sixième chapitre est composé d'un article scientifique intitulé *Study of the intravascular kinetics of large and small LDL using stable isotopes in humans*, soumis pour publication à la revue *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* en 2008. **Il est important de spécifier que ceci constitue la première version de l'article, tel qu'il était lors de sa soumission initiale à la revue *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. Il serait donc préférable que le lecteur se réfère à la version publiée de l'article lorsque celle-ci sera disponible** (probablement en 2010).

Le septième chapitre est composé d'un article scientifique intitulé *Intravascular kinetics of C-reactive protein and their relationships with features of the metabolic syndrome* paru dans la revue *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* en 2008.

Le huitième chapitre constitue une brève conclusion visant à intégrer les différentes observations présentées dans les chapitres 1 à 7 et résume les avenues de recherche qui pourraient être exploitées à la lumière des conclusions exposées dans la présente thèse.

Chapitre 1. Syndrome métabolique : facteur de risque émergent de la maladie cardiovasculaire

1.1 Définition et diagnostique clinique du syndrome

Les efforts pour améliorer la compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose au cours des dernières décennies ont mené à l'élaboration de nouveaux facteurs de risque. Soulignant la présence souvent concomitante de certaines anomalies métaboliques comme l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie et l'hypertension, Gerald Reaven suggéra en 1988 que l'expression commune de ces facteurs pourrait être favorisée dans un contexte de résistance à l'insuline (9). Ce regroupement de facteurs de risque, originalement baptisé « syndrome X » par Reaven, fut popularisé sous plusieurs appellations comme « syndrome de résistance à l'insuline » et « syndrome dysmétabolique X », mais l'appellation de « syndrome métabolique » est la plus couramment utilisée. De façon générale, ces termes sont interchangeables et servent à représenter l'ensemble des désordres métaboliques retrouvés fréquemment chez les individus obèses et qui seraient associés à un risque accru de diabète de type 2 et de MCV. En clinique, plusieurs algorithmes ont été proposés par les différents organismes de santé publique au cours des dernières années dans le but de cibler les individus atteints du syndrome (10). Celles-ci convergent toutes en regroupant sensiblement les mêmes facteurs de risque soient : la présence d'obésité, la dyslipidémie athérogène, l'hypertension et l'hyperglycémie. Le **tableau 1.1** résume trois des algorithmes cliniques les plus utilisés, soient celui de l'*Organisation mondiale de la santé* (11), celui de la *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), le plus utilisé, proposé en 2001 et mis à jour en 2004 par l'American Heart Association et le National Heart Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI)(12) et celui de la *Fédération internationale du diabète* (FID) (13). Une différence notoire réside dans la divergence des critères « prérequis » par l'OMS et la FID. Alors que la résistance à l'insuline prévaut selon les critères de l'OMS, le tour de taille constitue le paramètre central dans l'algorithmes suggérée par la FID. Cette différence majeure illustre bien le déchirement des communautés scientifiques et médicales à désigner

l'obésité viscérale ou la résistance à l'insuline comme pierre angulaire du syndrome métabolique (14-18). Cependant, la sensibilité à l'insuline, généralement mesurée par clamp euglycémique hyperinsulinémique ou par le test oral de tolérance au glucose, ne fait pas partie de l'éventail des tests cliniques routiniers, ce qui rend l'utilisation de l'algorithme de l'OMS peu pratique dans un contexte de recherche épidémiologique (19). Ainsi, l'ensemble de critères proposé par le NCEP/ATP III a été le plus utilisé depuis sa publication (10) en dépit de sa sensibilité moindre à cibler les individus résistants à l'insuline (14). En 2004, la valeur cible de glycémie à jeun proposée par le NCEP/ATP III fut harmonisée avec celle de la FID (10). La FID demeure cependant à l'avant-garde en proposant des valeurs de tour de taille cibles ajustées en fonction de l'ethnicité.

Tableau 1.1 : Algorithmes cliniques les plus cités du syndrome métabolique

Variable clinique	Organisation mondiale de la santé (1998)	NCEP/ATP III (2001) (mise à jour en 2004)	Fédération internationale du diabète (2005)
Résistance à l'insuline	<ul style="list-style-type: none"> • IG, GEJ, DT2 ou résistance à l'insuline (<i>variable essentielle</i>) <p>+ au moins 2 des critères suivant :</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non considérée <p>Au moins 3 des critères suivant :</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non considérée
Obésité	<ul style="list-style-type: none"> • Ratio taille/hanche: Hommes: > 0.90 Femmes: > 0.85 • IMC > 30 kg/m² 	<ul style="list-style-type: none"> • Tour de taille: Homme ≥ 102 cm Femmes ≥ 88cm 	<ul style="list-style-type: none"> • Tour de taille: Valeurs cibles spécifiques à population (<i>variable essentielle</i>) <p>+ au moins 2 des critères suivant :</p>
Lipides plasmatiques	<ul style="list-style-type: none"> • TG ≥ 1.7 mmol/l • HDL-C (mmol/l) Hommes: < 0.9 Femmes: < 1.0 	<ul style="list-style-type: none"> • TG ≥ 1.7 mmol/l • HDL-C (mmol/l) Hommes: < 1.0 Femmes: < 1.3 	<ul style="list-style-type: none"> • TG ≥ 1.7 mmol/l • HDL-C (mmol/l) Hommes: < 1.0 Femmes: < 1.3
Pression sanguine	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 140/90 mm Hg 	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 130/85 mm Hg 	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 130/85 mm Hg
Glycémie	<ul style="list-style-type: none"> • IG, GEJ ou DT2 	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 5.6 mmol/l 	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 5.6 mmol/l
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Microalbuminurie 		

NCEP/ATP III : National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III; IG : intolérance au glucose; GEJ : glycémie élevée à jeun; DT2 : diabète de type 2.

1.2 Prévalence du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est aujourd'hui considéré comme un phénomène mondial et toucherait environ 25% de la population en Amérique, en Europe et en Asie (10, 19, 20). La prévalence croissante du syndrome métabolique semble suivre la croissance fulgurante de l'obésité à l'échelle mondiale (21) et comme les différents critères du syndrome métabolique ont tendance à se détériorer avec le vieillissement, la prévalence du syndrome atteindrait jusqu'à 50% chez les plus de 60 ans (22).

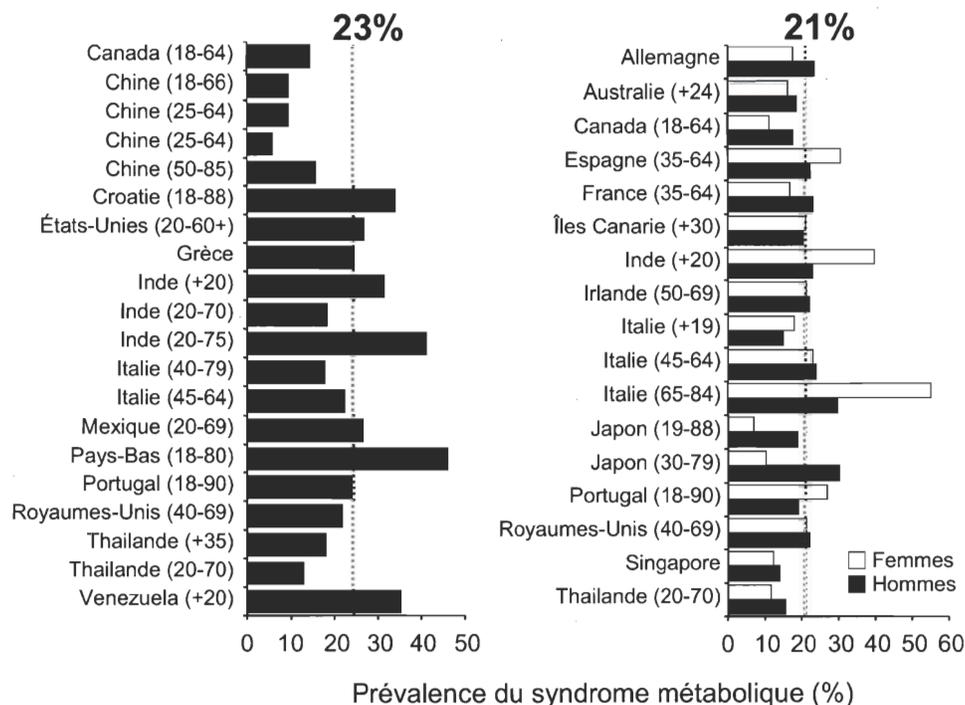


Figure 1.1: Estimation de la prévalence du syndrome métabolique selon les critères de NCEP/ATP III. Les chiffres entre parenthèses indiquent le domaine d'âge des populations étudiées. La ligne pointillée représente la moyenne non pondérée pour chaque graphique. La prévalence moyenne du syndrome métabolique dans le panneau de droite représente autant la prévalence moyenne du syndrome chez les hommes (21.1 %) que chez les femmes (21.2 %). Données tirées de (10, 23)

Les données épidémiologiques démontrent que la prévalence du syndrome métabolique varie considérablement en fonction des pays et des ethnies étudiés (10). Cette variabilité pourrait en partie être expliquée par l'utilisation de différents algorithmes cliniques du

syndrome dans les études recensées. En ce sens, l'algorithme proposé par la FID, comparativement aux algorithmes du NCEP et de l'OMS, aurait tendance à surestimer la prévalence du syndrome métabolique (24, 25). La prédisposition à développer le syndrome métabolique serait semblable chez les hommes et les femmes, fait surprenant considérant que les femmes montrent en général, avant la ménopause, une certaine forme de protection contre le développement de l'obésité, particulièrement de l'obésité viscérale, et des désordres métaboliques qui y sont reliés. La prévalence croissante de l'obésité observée chez les enfants et les adolescents (26) ainsi que le vieillissement généralisé de la population mondiale laisse présager une explosion de la prévalence du syndrome métabolique et de ses conséquences cliniques au cours des prochaines années. À la lumière de ces prévisions, il apparaît d'autant plus important de mieux comprendre les phénomènes physiologiques sous-jacents au syndrome métabolique afin de freiner sa progression et prévenir l'éclosion de ses conséquences cliniques.

1.3 Risque de MCV et diabète de type 2 associé au syndrome métabolique

Les études menées au cours des dernières années ont démontré de façon relativement constante que le syndrome métabolique était associé à un risque accru de MCV et de diabète de type 2 (27). Une récente méta-analyse regroupant 37 études et plus de 170 000 individus a démontré que les individus caractérisés par le syndrome métabolique semblaient 78% plus à risque d'être victime d'un événement cardiovasculaire (intervalle de confiance [IC] 95% du risque relatif [RR]: 1.58 – 2.00) comparativement aux individus non atteints par le syndrome (28). Selon cette étude, le risque relatif de MCV associé au syndrome métabolique serait plus élevé chez les femmes que chez les hommes (RR : 2.63 chez la femme vs 1.98 chez l'homme). Ces observations suggéreraient donc que les femmes seraient davantage affectées en termes de risque cardiovasculaire une fois qu'elles présentent les caractéristiques du syndrome comparativement aux hommes. La plus grande susceptibilité des femmes au développement de la MCV en lien avec le syndrome métabolique demeure inexplicée.

Quelques études ont procédé à l'ajustement du risque relatif de MCV associé au syndrome en tenant compte du risque relatif associé à chacune des composantes du syndrome lors d'analyses statistiques multivariées (29-31). L'analyse combinée de ces études a montré que, malgré cet ajustement, le risque relatif d'accident cardiovasculaire associé au syndrome métabolique demeurerait significativement élevé (RR : 1.54, IC 95% : 1.32-1.79), ce qui suggère que le syndrome métabolique conférerait un risque de MCV supérieur au risque prédit par la somme de ses composantes individuelles.

Le syndrome métabolique est également associé à un risque accru de diabète de type 2 (32, 33), lui-même un important facteur de risque de la MCV (34, 35). En accord avec cette affirmation, une récente méta-analyse regroupant 16 cohortes prospectives et totalisant plus de 40 000 hommes et femmes chez qui 2 600 cas de diabète avaient été diagnostiqués au cours d'un suivi clinique variant de 3 à 20 ans montra que le syndrome métabolique était associé à un risque quintuplé de développer le diabète de type 2, indépendamment de l'algorithme utilisé (36). Néanmoins, le risque relatif de diabète de type 2 associé à la présence du syndrome métabolique n'a pas systématiquement été démontré supérieur au risque associé à chacune des composantes individuelles du syndrome (30, 37). Ainsi, le syndrome métabolique ne serait pas supérieur à la somme de ses composantes en tant qu'outil clinique de prédiction du risque de diabète de type 2. En ce sens, Wilson et coll. ont démontré que la simple mesure de la glycémie à jeun serait équivalente à n'importe quelle combinaison de 3 anomalies métaboliques du syndrome dans l'estimation du risque relatif de diabète de type 2 (38).

Néanmoins, la persistance de l'incidence accrue de MCV et de diabète de type 2 observée chez les individus atteints du syndrome métabolique témoignerait de l'impact néfaste de la présence du syndrome sur la santé cardiovasculaire et sur l'intégrité du métabolisme énergétique.

1.4 Physiopathologie du syndrome métabolique

Les désordres physiologiques reliés à l'obésité et au syndrome métabolique ont été le sujet d'intenses recherches au cours des dernières décennies. Les prochaines sections résument l'essentiel de ces recherches.

1.4.1 Obésité

Étant donné la relation exponentielle unissant l'indice de masse corporelle et le gain de poids au développement du diabète de type 2 (39), l'obésité est considérée comme le plus important facteur de risque de diabète de type 2, autant chez l'homme que chez la femme (40, 41). Le lien causal unissant l'obésité à la résistance à l'insuline est appuyé par l'observation que le gain et la perte de poids sont respectivement corrélés à la diminution et à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline (42, 43). Dresser un résumé exhaustif des nombreux mécanismes physiologiques actuellement proposés pour expliquer le lien entre le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline ne fait pas partie des objectifs de la présente thèse. Toutefois, trois hypothèses majeures sont présentement considérées pour expliquer le rôle de l'obésité dans l'étiologie du syndrome métabolique et plus particulièrement dans la perte de sensibilité à l'insuline menant au diabète de type 2. Celles-ci consistent en l'hypothèse de la compétition entre le glucose et les acides gras libres comme substrat énergétique, l'hypothèse du stockage ectopique des graisses et l'hypothèse du rôle endocrinien du tissu adipeux (44).

1.4.1.1 Compétition des substrats énergétiques

Les individus obèses, résistants à l'insuline et diabétiques de type 2 présentent fréquemment des concentrations plasmatiques élevées d'acides gras libres, fait qui serait attribuable à la capacité réduite de l'insuline à freiner la lipolyse du tissu adipeux dans ces contextes physiologiques (45). Randle et coll. en 1963, ont montré par une série d'expériences in vitro sur des muscles de rats que la disponibilité accrue d'acides gras libres favorisait l'utilisation préférentielle des ces derniers comme substrat énergétique et entraînait une réduction de l'utilisation cellulaire du glucose (46). Appuyant ces observations, des études menées chez l'humain ont montré que l'augmentation des concentrations plasmatiques d'acides gras libres provoquée par l'injection intraveineuse simultanée d'une émulsion lipidique et d'héparine induisait une diminution marquée de l'oxydation du glucose (47). Certaines montrèrent également une réduction de la captation insulino-dépendante du glucose (48, 49).

Il est toutefois important de mentionner qu'un nombre relativement important d'études n'ont pu reproduire cette dernière observation (47). En effet, à l'opposé des hypothèses de Randle, plusieurs études chez l'humain ont montré que les glucides constituaient, à jeun, le substrat préférentiel du muscle squelettique même en présence de résistance à l'insuline (50). Ce phénomène était toutefois parallèle, en accord avec les observations de Randle, à une capacité réduite de l'insuline à induire une augmentation de l'oxydation des glucides au niveau du muscle squelettique lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique (51). À la lumière de ces observations, Kelley et Mandarino proposèrent donc le concept « d'inflexibilité métabolique » afin d'illustrer l'incapacité du muscle squelettique à privilégier l'oxydation des lipides en temps de jeûne et l'oxydation des glucides à l'état postprandial (50). Cette inflexibilité proviendrait, selon eux, de l'abondance chronique en circulation de lipides et de glucides en contexte d'obésité. L'oxydation préférentielle des glucides au niveau du muscle squelettique en présence d'un flux important d'acides gras, tel qu'observé en général chez les individus obèses, pourrait mener à l'accumulation de lipides au sein de cellules musculaires. Selon Kelley et Mandarino, c'est cette accumulation musculaire de lipides qui mènerait à la perte de sensibilité à l'insuline plutôt que la compétition entre substrats énergétiques proposée par Randle. Cette interprétation est directement associée à une autre hypothèse populaire proposée afin d'expliquer la perte de sensibilité à l'insuline liée à l'obésité, soit l'hypothèse du stockage ectopique des graisses.

1.4.1.2 Hypothèse du stockage ectopique des graisses

Le stockage ectopique des graisses résulterait d'un apport énergétique excédant la capacité de stockage du tissu adipeux, forçant ainsi la mise en réserve des surplus énergétiques au sein d'autres organes comme le muscle squelettique et le foie. La surcharge du tissu adipeux se refléterait physiologiquement par la présence d'adipocytes hypertrophiés et une accumulation de triglycérides au niveau musculaire et hépatique (52, 53). Fait intéressant, le même phénomène serait observé chez les individus lipodystrophiques, chez qui la capacité de stockage du tissu adipeux est extrêmement limitée. Ceux-ci montrent en effet une accumulation musculaire et hépatique de triglycérides et sont généralement résistants à l'insuline (54, 55). L'importance du tissu adipeux et du stockage approprié des graisses au

niveau de ce dernier dans la préservation de l'intégrité du métabolisme énergétique est également appuyée par des études ayant montré que la greffe de tissu adipeux chez des rats lipodystrophiques résistants à l'insuline permettait un rétablissement de la sensibilité à l'insuline (56). Plusieurs mécanismes ont été proposés dans le but d'expliquer la perte de sensibilité à l'insuline en lien avec le stockage ectopique des graisses. La plupart de ceux-ci sont associés au concept émergent de « lipotoxicité », qui réfère à l'ensemble des dommages causés et des dysfonctions physiologiques possiblement causées par un flux excessif d'acides gras.

Dans un premier temps, les triglycérides sont des molécules stables peu susceptibles d'interférer directement dans les fonctions métaboliques cellulaires (57). Le développement de la résistance à l'insuline a par conséquent plutôt été associé à l'accumulation intracellulaire de métabolites bioactifs comme les diacylglycérols (58) et les céramides (59) qui induirait l'activation des PKC et interfèrerait dans la signalisation du récepteur à l'insuline (60, 61). L'exposition prolongée aux acides gras à longues chaînes semblerait également nuire au bon fonctionnement des mitochondries et pourrait induire une diminution de la capacité oxydative de celles-ci en favorisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (62). Ces derniers, ayant été associés au phénomène du stress du réticulum endoplasmique, pourraient à leur tour stimuler la réponse inflammatoire au niveau cellulaire (63), ce qui pourrait nuire à la signalisation du récepteur à l'insuline (64) (voir prochaine section). Le stockage d'acides gras au niveau pancréatique pourrait également précipiter l'apoptose des cellules β et l'établissement du diabète de type 2 chez les individus atteints du syndrome métabolique (65).

1.4.1.3 Hypothèse du rôle endocrinien du tissu adipeux

Il est maintenant largement reconnu que le tissu adipeux sécrète bon nombre d'hormones et de cytokines qui pourraient avoir un impact direct sur la régulation du métabolisme énergétique et stimuler l'établissement d'une condition inflammatoire chronique. Parmi la liste des facteurs sécrétés par le tissu adipeux, la leptine, l'adiponectine, le facteur alpha nécrosant des tumeurs (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6) joueraient des rôles clés dans la pathophysiologie du syndrome métabolique. La résistine est également souvent ajoutée à

cette liste. Cependant, l'implication directe de la résistine dans le développement de la résistance à l'insuline, initialement observée chez le modèle animal, s'avère visiblement moins évidente chez l'humain (66). Alors que la résistine est synthétisée principalement par le tissu adipeux chez la souris, l'analogue humain serait préférentiellement exprimé au niveau de la moelle osseuse (67) et l'importance de son rôle chez l'humain reste à démontrer (66, 68).

1.4.1.3.1 Facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNF- α)

Le TNF- α , d'abord identifié comme un facteur sécrété par les monocytes et les macrophages, fut, en 1983, le premier médiateur inflammatoire à être relié à la résistance à l'insuline (69). Hotamisligil et coll. furent les premiers, en 1993, à démontrer l'expression du (TNF- α) par les adipocytes et à démontrer son expression accrue chez les individus obèses (70). La résistance à l'insuline induite par le TNF- α serait principalement due à la répression de l'expression du transporteur de glucose GLUT-4 (71, 72) induite par l'activation du facteur nucléaire- κ B (*nuclear factor- κ B*, NF- κ B) (73) et au blocage de la signalisation intracellulaire en aval du récepteur à l'insuline (74-76). Le tissu adipeux, le foie (77) et le muscle squelettique (78, 79), les trois centres névralgiques du métabolisme énergétique, seraient tous sensibles à la perte de sensibilité à l'insuline induite par l'effet autocrine et paracrine du TNF- α . Toutefois, une large proportion du TNF- α produit au niveau du tissu adipeux serait directement captée par les adipocytes et serait une cause importante de la perte de sensibilité à l'insuline du tissu adipeux (80, 81). Chez les individus obèses, l'infiltration importante de macrophages au niveau du tissu adipeux a été démontrée (82). Ces macrophages actifs constitueraient une source supplémentaire de TNF- α et contribuerait de façon marquée au développement de la résistance à l'insuline spécifique du tissu adipeux (83, 84). Le TNF- α influencerait également l'expression des autres adipokines au niveau du tissu adipeux. En présence de TNF- α , l'expression de l'adiponectine serait réprimée (85, 86) et l'expression de l'IL-6 serait stimulée (87). L'impact du TNF- α sur l'expression de la leptine est mitigé, une relation positive et inverse entre l'expression de ces deux adipokines ayant toutes deux été observées (88, 89). Le TNF- α pourrait aussi affecter la capacité de stockage du tissu adipeux en stimulant l'apoptose des adipocytes et en bloquant la différenciation des pré-adipocytes (90, 91). En

réduisant le nombre d'adipocytes, la production accrue de TNF- α pourrait donc aussi mener au stockage ectopique des graisses, exacerbant ainsi le développement de la résistance à l'insuline.

1.4.1.3.2 Leptine

La leptine, découverte au cours des années 1990 (92, 93), serait, via son récepteur hypothalamique (94), un modulateur important de l'apport et de la dépense énergétique (95). La sécrétion de leptine serait fonction du contenu lipidique des adipocytes, les adipocytes hypertrophiés sécrétant davantage de leptine que ceux de taille normale (96, 97). Une réduction des concentrations plasmatiques de leptine induirait une diminution de la dépense énergétique, de la satiété et de la sensibilité à l'insuline (98). En accord avec ces observations, la déficience en leptine, un phénomène rare, a été associée au développement précoce et sévère de l'obésité chez l'humain (95). Des données récentes suggèrent que la leptine serait aussi un activateur potentiel de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (99). Cette dernière est un régulateur important du métabolisme énergétique qui, par son activation, favoriserait l'activation des voies cataboliques et l'inhibition des voies anaboliques afin de renflouer les réserves d'adénosine triphosphate (ATP) (100). Paradoxalement, les individus obèses et résistants à l'insuline montrent une sécrétion accrue de leptine (101, 102), ce qui a mené à l'élaboration du concept de résistance à la leptine (103). Les mécanismes physiologiques expliquant la perte de sensibilité à la leptine chez les individus obèses sont encore obscurs. Cependant, les expériences menées à l'aide de modèles animaux suggèrent que des anomalies dans le transport hémato-encéphalique de la leptine, de même qu'au niveau de l'expression du récepteur de la leptine et de la signalisation intracellulaire de ce dernier pourraient être impliquées (104).

1.4.1.3.3 Adiponectine

L'adiponectine, découverte au cours des années 1990 (105-108), est sécrétée exclusivement par le tissu adipeux et ses concentrations plasmatiques sont, contrairement aux autres adipokines, paradoxalement réduites chez les individus obèses (107, 109, 110). La restriction calorique (111), la perte de poids massive suite à la chirurgie bariatrique (112, 113) ou la perte de poids soutenue par restriction calorique (20 kg en 20 semaines) (114)

seraient associées à une augmentation des concentrations plasmatiques d'adiponectine. La réponse à la perte de poids modérée serait quant à elle davantage mitigée (115, 116). De faibles concentrations plasmatiques d'adiponectine seraient associées à une sensibilité à l'insuline diminuée (117, 118) et pourraient représenter un risque accru de diabète de type 2 (119, 120) et de MCV (121). Une récente méta-analyse par Sattar et coll. a cependant remis en question la présence d'un lien unissant des concentrations plasmatiques diminuées d'adiponectine à une incidence accrue de la MCV (122). Chez la souris, l'administration d'adiponectine permet de rétablir la sensibilité à l'insuline et favoriserait la perte de poids (123, 124). L'adiponectine agit principalement au niveau du muscle squelettique, où elle stimulerait l'oxydation des acides gras (125), et au niveau du foie, où elle réprimerait la néoglucogenèse (126). L'adiponectine présenterait aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti-athérogénique en réprimant l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine (127), en plus d'inhiber l'expression de NF- κ B induite par le TNF- α (128). L'action bénéfique de l'adiponectine serait, tout comme la leptine, potentiellement due à l'activation de l'AMPK (126). L'adiponectine se présente sous trois formes majeures en circulation, définies par son degré de multimérisation (129). Les complexes de poids moléculaires élevés (18-mères) auraient la plus grande activité biologique et leur représentation serait réduite chez les individus résistants à l'insuline et les diabétiques de type 2 (129, 130). Plusieurs facteurs seraient en mesure d'expliquer la diminution des concentrations d'adiponectine observée en contexte d'obésité. D'abord, l'effet autocrine du TNF- α au niveau du tissu adipeux serait susceptible d'interférer avec l'expression du gène de l'adiponectine (85, 86). D'autres facteurs, comme le stress du réticulum endoplasmique, les dérivés réactifs de l'oxygène et l'hypoxie du tissu adipeux seraient aussi impliqués dans la réduction de la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux dans le contexte de l'obésité et de la résistance à l'insuline (131-133).

1.4.1.3.4 Interleukine-6

L'IL-6, comme le TNF- α , a d'abord été identifiée comme une cytokine sécrétée par les monocytes et les macrophages avant que son expression par les adipocytes ne soit démontrée (134, 135). Bien que les individus obèses montrent des concentrations plasmatiques élevées d'IL-6 (135), et que celles-ci soient fortement corrélées à l'indice de

masse corporelle, au tour de taille et à la masse adipeuse (136, 137), le rôle de l'IL-6 dans l'étiologie du syndrome métabolique est plutôt mitigé. Malgré la relation inverse observée entre les concentrations plasmatiques d'IL-6 et la sensibilité à l'insuline (138, 139), parfois même indépendamment de la présence d'obésité (140), peu de données moléculaires appuient l'hypothèse d'un rôle direct de l'IL-6 dans le développement de la résistance à l'insuline et du syndrome métabolique (139). Une partie de la confusion est alimentée, entre autres, par l'observation que l'exercice aigu entraîne la sécrétion d'IL-6 au niveau du muscle squelettique, sécrétion qui stimulerait l'oxydation des acides gras et la captation musculaire du glucose et qui semblerait donc bénéfique au plan métabolique (141). Ces observations sont également supportées par des expériences ayant démontré que l'injection d'IL-6 chez des individus sains semblait stimuler l'oxydation du glucose et l'augmentation du taux métabolique mesuré par calorimétrie indirecte (142, 143). L'effet potentiellement négatif de l'IL-6 en contexte d'obésité pourrait donc être indirect et reposerait en partie sur l'expression d'autres adipokines plus activement impliquées dans l'étiologie du syndrome métabolique. Appuyant cette hypothèse, l'IL-6 inhiberait directement la synthèse d'adiponectine au niveau du tissu adipeux (114, 144) tout en stimulant la sécrétion de cytokines associée à la phase aiguë de l'inflammation, comme la protéine C-réactive (145).

1.4.1.4 Obésité : importance de la localisation du tissu adipeux.

Un nombre croissant d'études suggèrent que la localisation des dépôts adipeux serait un indicateur majeur de leur implication dans le développement des désordres physiologiques associés au syndrome métabolique. Le tissu adipeux accumulé au niveau des compartiments viscéraux, malgré qu'il ne représente généralement que 6 à 20% de la masse adipeuse totale (146), montrerait une activité métabolique supérieure au tissu adipeux sous-cutané (18, 147), serait davantage résistant à l'action anabolique de l'insuline (148), serait plus sensible à l'action lipolytique des catécholamines (149) et les adipocytes qui le composent seraient plus sensibles à l'apoptose (91). La lipolyse accrue du tissu adipeux viscéral serait en partie contrebalancée par une captation augmentée d'acides gras, permettant de préserver la taille des adipocytes (150). Les acides gras libres issus de la lipolyse du tissu adipeux viscéral se déversant directement dans la veine porte (44), ceux-ci stimuleraient la néoglucogenèse et la sécrétion de triglycérides hépatiques, soutenant l'état

hyperglycémique et le développement de la dyslipidémie athérogène (9, 151, 152). La contribution supérieure du tissu adipeux viscéral à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'acides gras libres est cependant mitigée, étant donné que celui-ci ne représente qu'une faible proportion du tissu adipeux total présent chez les individus obèses. Wajchenberg et coll. ont cependant démontré que pour un même indice de masse corporelle, les individus obèses présentant un degré d'adiposité viscérale accru montraient une sensibilité à l'insuline moindre et des concentrations plasmatiques augmentées de triglycérides comparativement aux obèses présentant un degré d'adiposité viscérale comparable à celui d'individus de poids normal (149). Leurs observations supporteraient donc le rôle spécifique du tissu adipeux viscéral dans la dérégulation du métabolisme énergétique. Enfin, le tissu adipeux viscéral se distinguerait également du tissu adipeux sous-cutané par sa sécrétion réduite de leptine (101, 153) et d'adiponectine (154) et par sa production accrue de TNF- α (155) et d'IL-6 (135), patron de sécrétion qui favoriserait le développement de la résistance à l'insuline et de la réponse inflammatoire systémique.

1.4.2 Résistance à l'insuline

L'insuline joue un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie énergétique en coordonnant le stockage et l'utilisation des substrats énergétiques dans le tissu adipeux, le foie et le muscle (85). La hausse des concentrations plasmatiques d'insuline en état postprandial stimule la captation du glucose et sa conversion en glycogène au niveau du muscle et du foie, en plus de stimuler l'activité de la lipase lipoprotéique et l'estérification des acides gras par le tissu adipeux. De façon parallèle, l'insuline inhibe la production hépatique de glucose en supprimant la glycogénolyse et la néoglucogenèse tout en réduisant la sécrétion d'acides gras libres par le tissu adipeux en réprimant l'activité des différentes lipases impliquées dans la lipolyse du tissu adipeux soient la lipase hormono-sensible, la lipase des triglycérides du tissu adipeux et la lipase des monoglycérides (85).

La résistance à l'insuline se définit comme une réponse biologique affaiblie comparativement à la réponse attendue pour une dose physiologique donnée d'insuline (85). La résistance à l'insuline peut être estimée par le test HOMA (*homeostasis assessment model*), une méthode simple basée sur la mesure de la glycémie et de l'insulinémie à jeun,

populaire en épidémiologie (156). Toutefois, la méthode du clamp hyperinsulinémique euglycémique, qui permet de déterminer directement le taux maximal de disposition plasmatique du glucose, demeure la méthode étalon en clinique (157). La résistance à l'insuline se traduit par la captation réduite du glucose au niveau cellulaire, généralement compensée par une hyperinsulinémie pour forcer le retour de la glycémie à une valeur normale. La plupart des individus obèses présenteraient un certain degré de résistance à l'insuline (149, 158, 159). Ainsi, l'impact physiologique de l'insulino-résistance dans le développement du syndrome métabolique est difficile à dissocier de l'impact de l'obésité. Cependant, la présence répandue de l'insulino-résistance chez les individus lipodystrophiques (54, 160) suggère que la perte de sensibilité à l'insuline proviendrait davantage de l'incapacité de l'organisme à gérer, à long terme, un apport énergétique excédant ses capacités d'oxydation et, surtout, de stockage plutôt qu'à l'obésité même. La pathophysiologie de la résistance à l'insuline ainsi que son impact métabolique au niveau du tissu adipeux ayant été revue dans la section précédente, les prochaines sections se limiteront à décrire le phénomène de résistance à l'insuline au niveau du foie et du muscle lisse.

Le muscle squelettique est responsable de 80 à 90% de la captation du glucose induite par l'insuline (161) et cette capacité est significativement réduite chez les individus obèses résistants à l'insuline (42, 43). La résistance à l'insuline dans le muscle se traduirait par une diminution du transport transmembranaire du glucose due à une diminution de la translocation du transporteur GLUT4 (43, 162) et par une diminution marquée de l'activité glycogénique (42, 163). L'impact de la résistance à l'insuline sur le taux d'oxydation du glucose dans le muscle squelettique est quant à lui passablement mitigé (164-167). Les mécanismes moléculaires responsables de la perte de sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique sont encore pour la plupart inconnus, mais semblent être liés au phénomène du stockage ectopique des graisses décrit précédemment (45, 168), ainsi qu'à l'effet paracrine des adipokines, dont le TNF- α (78, 79). Le muscle squelettique étant le principal site de métabolisation du glucose, sa résistance à l'action de l'insuline jouerait un rôle important dans le développement de l'hyperinsulinémie compensatoire, la surcharge des cellules- β et, éventuellement, dans le développement du diabète de type 2 (161, 169).

Le foie, par son rôle central dans la régulation de la glycémie et de la lipémie, est un acteur important de l'homéostasie énergétique. En temps normal, l'insuline réprime la production hépatique de glucose et la sécrétion de triglycérides sous forme de lipoprotéines de très faible densité (*very low-density lipoproteins*, VLDL). Ainsi, les individus résistants à l'insuline montreraient une répression moins efficace de la production hépatique de glucose par l'insuline (170, 171) qui serait exacerbée par la présence de concentrations plasmatiques accrues d'acides gras libres et de glucagon (171). La production hépatique de glucose accrue serait due à un débalancement de l'activité de la glucose-6-phosphatase (G6P) et de la glucokinase (GK), respectivement impliquées dans le relargage et l'absorption du glucose au foie (172, 173). L'activité de la G6P serait stimulée en présence d'acides gras libres (151). Le flux important d'acides gras libres au niveau hépatique aurait aussi comme conséquence de favoriser le dépôt de triglycérides au foie, un phénomène qui serait étroitement lié au développement du syndrome métabolique (53, 174, 175), indépendamment de la présence d'obésité (176). Enfin, l'accumulation de triglycérides hépatiques mènerait, en dépit de concentrations élevées d'insuline, à la sécrétion de VLDL riches en triglycérides (177, 178), un facteur important dans le développement de la dyslipidémie athérogène.

1.4.3 Dyslipidémie athérogène

La dyslipidémie athérogène associée au syndrome métabolique constitue, avec l'hypertension et l'inflammation, un des principaux chaînons reliant l'obésité et le syndrome métabolique à l'augmentation du risque de MCV (179, 180). Le cholestérol plasmatique est sans contredit la pierre d'assise de l'édification de la plaque athéromateuse. Toutefois, les individus atteints du syndrome métabolique présentent des concentrations plasmatiques de cholestérol normales ou marginalement élevées (181, 182). La dyslipidémie athérogène du syndrome métabolique se caractérise plutôt par des concentrations plasmatiques élevées de triglycérides et réduites de HDL-C (179, 183). Une description élargie de cette dyslipidémie inclut également des concentrations plasmatiques élevées d'apoB-100, de résidus de VLDL et de chylomicrons et la présence de LDL petites et denses (179). L'indépendance de la relation entre les concentrations plasmatiques de triglycérides et le risque de MCV, autrefois vivement débattue, est maintenant largement

acceptée (184-186). Cette relation est supportée, entre autres, par le fait que l'accumulation de triglycérides, au foie et en circulation, constituerait l'élément central dans l'établissement de la plupart des anomalies métaboliques associées à la dyslipidémie athérogène du syndrome métabolique (177, 187).

L'apoB-100, l'apolipoprotéine structurale majeure des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine endogène, est synthétisée de façon constitutive par les hépatocytes (188, 189). L'augmentation du contenu hépatique de triglycérides et l'augmentation de l'activité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (*microsomal triglyceride transfert protein*, MTP) favoriserait la stabilisation des domaines hydrophobes de l'apoB-100 lors de sa traduction, et la maturation des VLDL dans le réticulum endoplasmique (190). La stimulation de la production de VLDL conjuguée à la diminution de l'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux (191, 192) mèneraient à l'accumulation des triglycérides en circulation (193, 194). Une diminution de l'activité du récepteur hépatique des LDL, aussi observée dans le contexte du syndrome métabolique, pourrait favoriser l'accumulation des IDL et des LDL (195). Le contenu en cholestérol des particules LDL étant partiellement réduit (196), la cholestérolémie ne serait que marginalement augmentée malgré l'élévation du nombre de lipoprotéines contenant l'apoB-100 en circulation. De ce fait, Williams et coll. ont démontré que la détérioration du profil métabolique reflétée par l'accumulation de facteurs de risque du syndrome métabolique est fortement associée à une augmentation constante des concentrations plasmatiques d'apoB-100, relation qu'ils n'ont pu observer avec les concentrations plasmatiques de cholestérol (197). Le risque cardiovasculaire associé au syndrome métabolique serait donc davantage fonction du nombre élevé de lipoprotéines circulantes, plutôt que de la quantité de cholestérol en circulation, hypothèse qui est supportée par plusieurs études cliniques et épidémiologiques (197, 198).

L'augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoB-100 est généralement concomitante à un effondrement des concentrations plasmatiques de HDL-C, un important facteur de risque de MCV (199). L'association inverse entre les concentrations de HDL circulantes et le risque de MCV serait principalement supportée par le rôle des HDL dans le processus permettant le transport du cholestérol excédentaire en périphérie vers le foie, où celui-ci est excrété sous forme d'acides biliaires (199-201). Le

cholestérol des HDL peut être directement transféré au foie, via le récepteur SR-B1, où y être acheminé suite à son transfert vers les lipoprotéines contenant l'apoB-100 en échange de triglycérides (202). L'échange cholestérol-triglycéride est catalysé par la protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesterol ester transfer protein*, CETP) (202). En présence de concentrations élevées de triglycérides, l'importance du gradient triglycérides-cholestérol pourrait favoriser l'enrichissement excessif des HDL en triglycérides par l'action de la CETP. L'hydrolyse de ces triglycérides par la lipase hépatique, dont l'activité pourrait être augmentée en contexte de résistance à l'insuline (203), mènerait à la dissociation de l'apoA-I (204, 205), la protéine structurale des HDL, et favoriserait son élimination de la circulation (206, 207). La somme de ces différents processus consisterait en une diminution des concentrations de HDL-C et contribuerait de façon importante à l'augmentation du risque de MCV dans le contexte du syndrome métabolique. Ces mêmes mécanismes sont avancés pour expliquer la prédominance en circulation de LDL denses et de diamètre réduit observée dans le contexte du syndrome métabolique, un autre facteur de risque important de MCV décrit plus en détail dans la section 2.2.4 (179, 208-211).

Chacune des anomalies lipidiques associées au syndrome métabolique et à la résistance à l'insuline est susceptible de conférer un risque accru de MCV. Toutefois, il est d'avis général que l'accumulation de ces anomalies favoriserait l'augmentation du risque de MCV de façon synergique. Ainsi, Lamarche et coll. ont observé que les individus montrant à la fois des concentrations plasmatiques d'insuline et d'apoB-100 élevées et des LDL de diamètre réduit montreraient un risque cardiovasculaire 20 fois plus grand que les individus ne présentant aucune de ces aberrations métaboliques (209). Ces facteurs, découlant pour la plupart de l'abondance de triglycérides, permettraient d'expliquer, du moins en partie, le risque accru de MCV observé chez les individus atteints du syndrome métabolique.

1.4.4 Hypertension

L'hypertension est un important facteur de risque indépendant de MCV observé de façon répétée chez les individus obèses (212) et hyperinsulinémiques (213). De ce fait, l'impact relatif de l'obésité et de la résistance à l'insuline sur le développement de l'hypertension est encore une fois difficile à dissocier (213, 214). Le lien étroit unissant l'obésité,

l'hypertension et la résistance à l'insuline est supporté par le fait qu'une modulation commune de ces paramètres a été observée lors d'études d'intervention nutritionnelle (215) et pharmacologique (216). Cependant, aucune étude jusqu'à maintenant n'a réussi à déterminer de façon convaincante si la résistance à l'insuline précède le développement de l'hypertension ou vice versa (213, 217). Il est peu probable que l'hypertension puisse jouer un rôle prépondérant dans le développement de la résistance à l'insuline puisque l'hypertension secondaire ne semble pas engendrer une perte de sensibilité à l'insuline (218). L'insuline a un important effet vasodilatateur, principalement au niveau du muscle. Ceci favoriserait la canalisation du glucose vers son principal site de métabolisation (219). Cet effet serait dû à la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) stimulé directement par l'activation de l'enzyme eNOS (*endothelial NO synthase*) par l'insuline (220). Il est actuellement proposé que la fonction endothéliale, définie par la biodisponibilité endothéliale de NO, serait diminuée dans le contexte du syndrome métabolique. Les facteurs de signalisation en aval du récepteur à l'insuline impliqués dans le transfert de GLUT4 à la membrane plasmique (phosphatidylinositol 3-kinase et protéine kinase B) seraient en partie responsables de l'activation de l'enzyme eNOS par l'insuline (221, 222). Ainsi, la répression de la signalisation intracellulaire en réponse à l'insuline, telle qu'observée en contexte de résistance à l'insuline, pourrait directement mener à une diminution de l'activation de eNOS et favoriser le développement de l'hypertension associée au syndrome métabolique. Le patron de sécrétion d'adipokines associé au syndrome métabolique pourrait aussi jouer un rôle important dans la détérioration de la fonction endothéliale. La leptine (223, 224) et l'adiponectine (120, 225), dont l'activité biologique serait diminuée dans le syndrome métabolique, auraient toutes deux un impact bénéfique sur la fonction endothéliale. À l'opposé, la sécrétion augmentée d'IL-6 (226, 227), de TNF- α (228, 229) et d'acides gras libres (230, 231) pourrait tous nuire à la fonction endothéliale et favoriser l'hypertension. Chez les individus obèses, un déséquilibre du système rénine-angiotensine a également été observé. Une production accrue locale d'angiotensinogène (précurseur de l'angiotensine, elle-même précurseur de l'angiotensine 2, version active de l'enzyme) au niveau du tissu adipeux stimulée par la présence de dérivés réactifs de l'oxygène et de facteurs pro-inflammatoires, pourrait mener à une augmentation systémique de la pression sanguine (232). Enfin, toujours en lien avec le tissu adipeux viscéral,

l'expression augmentée de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 stimulerait la conversion de la cortisone en cortisol et pourrait également contribuer au développement de l'hypertension (233). À la lumière de ces dernières observations, il apparaît donc que le dysfonctionnement du tissu adipeux pourrait jouer un rôle central dans l'étiologie de l'hypertension associée au syndrome métabolique. En revanche, la perte partielle de l'effet vasorelaxant de l'insuline pourrait contribuer au maintien de l'état hyperglycémique hyperinsulinémique en réduisant le flot sanguin et la captation du glucose au niveau musculaire.

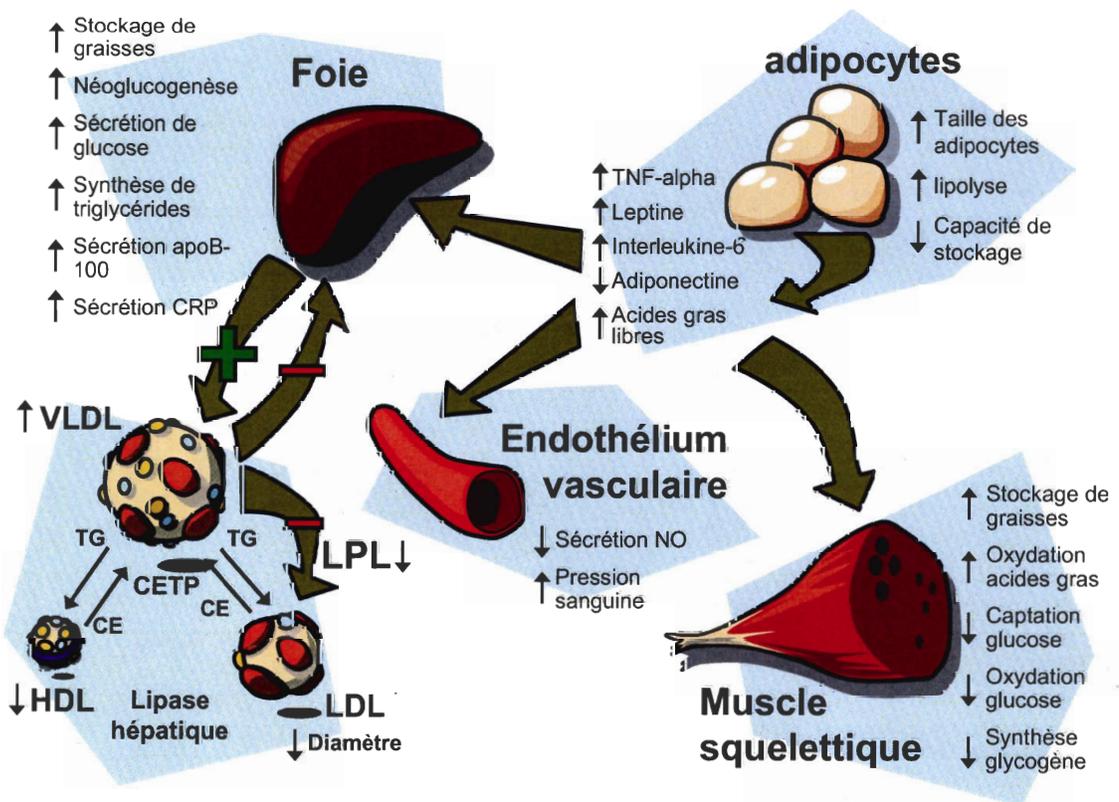


Figure 1.2 : Résumé des anomalies métaboliques associées au syndrome métabolique.

1.5 Prévention et traitement du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique constitue un ensemble de facteurs de risque de MCV et de diabète de type 2 qui trouvent leur fondement dans la balance énergétique positive, qui elle, en revanche, est influencée par une constellation de facteurs environnementaux et génétiques. L'adoption de saines habitudes de vie et l'utilisation d'agents pharmaceutiques

constituent les stratégies thérapeutiques actuellement proposées pour le traitement des différents critères du syndrome métabolique.

1.5.1 Habitudes de vie

La pluralité des facettes du syndrome métabolique favorise les stratégies de prévention et de traitement affectant simultanément plusieurs des systèmes physiologiques impliqués dans l'étiologie du syndrome (10, 179). Étant donné le rôle central de l'obésité dans l'étiologie du syndrome métabolique, les stratégies d'intervention visent d'abord la perte de poids. À ce titre, les recommandations actuelles ciblent la perte de poids modérée de l'ordre de 7 à 10 % au cours des 6 à 12 premiers mois d'intervention (20). Il est maintenant largement accepté qu'une telle intervention est bénéfique sur l'ensemble des facteurs de risque du syndrome métabolique (20, 234, 235). Deux études cliniques importantes ont démontré que la perte de poids était associée à une diminution de l'incidence du diabète de type 2 chez des individus caractérisés par une hyperglycémie à jeun ou une intolérance au glucose (236, 237). Une de celles-ci, menée par Knowler et coll. chez plus de 3000 personnes initialement non-diabétiques a d'ailleurs comparé l'impact d'une restriction calorique combinée à une augmentation de la pratique d'activité physique à une intervention pharmacologique utilisant la metformine, un inhibiteur de la production hépatique de glucose, sur l'incidence du diabète de type 2 sur 4 ans. La perte de poids moyenne de 5.6 kg observée suite à l'intervention au plan des habitudes de vie était associée à une diminution de 39% du nombre de nouveaux cas de diabète de type 2 comparativement au groupe assigné à l'intervention pharmacologique (237). Ces conclusions furent reproduites par une étude semblable, la *Diabetes Prevention Program Randomized Trial* qui regroupait plus de 3000 hommes et femmes intolérants au glucose compara l'impact de l'adoption de saines habitudes de vie à celui d'un traitement à la metformine sur l'incidence du syndrome métabolique. Celle-ci démontra que l'incidence cumulative du nombre d'individus atteints du syndrome après 3 ans était inférieure dans le groupe assigné à l'intervention au plan des habitudes de vie (38 %) comparativement à celle observée chez le groupe traité à la metformine (50 %) (238).

Même en absence d'une perte substantielle de poids, une amélioration qualitative de l'alimentation pourrait aussi avoir un impact bénéfique sur les composantes du syndrome métabolique (234). L'impact favorable de la diminution de la consommation de cholestérol, d'acides gras saturés et d'acides gras trans sur les concentrations plasmatiques d'apoB-100 a été démontré (239-241). Une diminution de la consommation de glucides a aussi été associée à une réduction des concentrations plasmatiques de triglycérides (242-244), une diminution de la pression sanguine (245) et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (246). Finalement, substituer partiellement l'apport en glucides par l'apport d'acides gras insaturés pourrait également avoir des effets bénéfiques sur les composantes de la dyslipidémie athérogène (242, 247).

Ces résultats intéressants confirment donc le fort potentiel de l'amélioration des habitudes de vie comme stratégie de prévention et de traitement du syndrome métabolique. Bien que l'amélioration à long terme des facteurs de risque associés au syndrome métabolique par l'adoption d'un style de vie sain suggère une diminution du risque de MCV, les données cliniques appuyant une telle relation sont toutefois encore attendues.

1.5.2 Agents pharmacologiques

Lorsque l'adoption de saines habitudes de vie est insuffisante pour corriger les anomalies associées au syndrome métabolique et réduire de façon satisfaisante le risque de MCV, l'utilisation d'agents pharmacologiques peut être considérée. Contrairement aux habitudes de vie, les molécules pharmacologiques ont souvent un effet bénéfique restreint à leur cible physiologique et ne permettent donc pas l'amélioration simultanée de tous les facteurs de risque du syndrome métabolique. Parmi les agents pharmacologiques disponibles, les statines semblent montrer un effet bénéfique sur le risque de MCV peu importe le contexte métabolique (248, 249). Ainsi, celles-ci constituent l'option pharmacologique de premier choix chez les individus atteints du syndrome métabolique (19). Les agents de la classe des fibrates, des agonistes de PPAR-alpha, stimulent l'oxydation des acides gras hépatiques, l'élimination des triglycérides plasmatiques et l'augmentation des concentrations plasmatiques de HDL-C (250). Leur utilisation a également été associée à une diminution du risque de MCV (250, 251) et serait à considérer dans le traitement du syndrome

métabolique en monothérapie (19, 250) ou combiné à l'utilisation d'une statine (252). La metformine est déjà largement utilisée dans la prévention et le traitement du diabète de type 2 et semble montré des effets positifs chez les individus atteints du syndrome métabolique (237, 238, 253). Les agonistes de PPAR- γ stimulent la différenciation et la maturation adipocytaire et semblent être efficaces à rétablir la sensibilité à l'insuline (254) et la fonction endothéliale (255), mais, contrairement à la metformine(183, 238), favorisent le gain de poids (256). L'acide nicotinique est reconnu pour son potentiel de réduction de la triglycéridémie et demeure l'agent pharmaceutique avec l'effet le plus marqué sur l'augmentation des concentrations plasmatiques de HDL-C (257, 258), mais son utilisation est souvent mal tolérée et pourrait nuire au contrôle glycémique (258, 259). Les bloqueurs β adrénergiques (β blockers) et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin-converting enzyme*, ACE), sont, quant à eux, recommandés dans le traitement de l'hypertension et contribue à une diminution significative du risque de MCV (260), même chez les diabétiques de type 2 (261). Les inhibiteurs de l'ACE pourraient aussi prévenir le développement du diabète de type 2 en rétablissant partiellement la sensibilité à l'insuline (262, 263). Enfin, la prévalence croissante de l'obésité et de ses conséquences cliniques a littéralement donné le coup d'envoi à la course au développement d'agents pharmaceutiques stimulant la réduction de la masse adipeuse (264). Parmi ceux-ci, le Rimonabant, un inhibiteur du récepteur endocannabinoïde-1 actuellement en phase clinique de développement, était un candidat intéressant qui, en plus de stimuler la perte de poids, semblait favoriser l'amélioration de la lipémie et de la sensibilité à l'insuline (265). Toutefois, ses effets secondaires importants, notamment la dépression et le suicide, éclipsaient ses bénéfices au plan métabolique et son utilisation clinique n'est plus recommandée (266).

Chapitre 2. Facteurs et concepts physiologiques connexes au syndrome métabolique : apolipoprotéine C-III, hétérogénéité des LDL et protéine C-réactive

Aux critères officiellement inclus dans les différents algorithmes cliniques du syndrome viennent se greffer différents facteurs métaboliques qui ont suscité l'intérêt scientifique par 1) leur prévalence chez les individus caractérisés par le syndrome métabolique et; 2) leur capacité à prédire le risque de MCV de façon indépendante dans certaines études épidémiologiques. Ainsi, une description clinique élargie du syndrome inclue des concentrations plasmatiques élevées d'apoC-III, de LDL petites et denses et de protéine C-réactive. Ces trois facteurs constituent les éléments qui ont été approfondis au cours des travaux de la présente thèse. Les rôles physiologiques de chacun de ces facteurs ainsi que leur implication présumée dans l'étiologie du syndrome sont revus et discutés dans les sections qui suivent.

2.1 Apolipoprotéine C-III

Les apolipoprotéines de la classe C, qui regroupent l'apoC-I, C-II et C-III, sont des protéines de faible poids moléculaire associées aux lipoprotéines. Le rôle important de l'apoC-III, la plus abondante des apoC en circulation, dans l'expression de la dyslipidémie athérogène reliée au syndrome métabolique a récemment été mis en évidence. Cette section résume les connaissances actuelles de la physiologie et du métabolisme de l'apoC-III ainsi que les différents facteurs qui sous-tendent son implication dans l'étiologie du syndrome métabolique.

2.1.1 Physiologie

Le peptide mature de l'apoC-III comprend 79 acides aminés et est synthétisé et excrété majoritairement au niveau des hépatocytes et dans une moindre mesure au niveau des entérocytes (267). Présente en circulation à des concentrations avoisinant les 100 mg/l (268-270), l'apoC-III est principalement associée aux HDL et aux lipoprotéines riches en

triglycérides (LRT), les VLDL et les chylomicrons (271). En période de jeûne, 60% de l'apoC-III serait associé aux HDL (271) alors qu'en état postprandial, celle-ci serait graduellement transférée aux LRT nouvellement sécrétées (272), pour ensuite retourner au HDL suivant l'hydrolyse des LRT (273). Le transfert d'apoC-III entre les HDL et les LRT ne nécessiterait pas de protéine intermédiaire ni même d'interaction directe entre donneurs et accepteurs (274). Ces observations suggèrent que la distribution de l'apoC-III entre les LRT et les HDL constituerait un état d'équilibre et que le transfert d'apoC-III entre les fractions lipoprotéiques serait uniquement fonction de leur concentration respective (275-277). Cependant, certaines études réalisées à l'aide de radio-isotopes ont suggéré que 30 à 60% de l'apoC-III ne serait pas transférable entre les LRT et les HDL (278, 279), observations qui ont été supportées par certaines études menées à l'aide d'isotopes stables in vivo chez l'humain (280). Une étude récente ayant mis au point une nouvelle méthode de purification des apoC à l'aide de micelles lipidiques suggère toutefois que l'observation d'une fraction non échangeable d'apoC-III pourrait en fait être un artefact méthodologique dû à une purification imparfaite de l'apoC-III associée aux HDL (281). Pendant que le problème de « l'échangeabilité » de l'apoC-III demeure partiellement irrésolu, l'hypothèse de l'existence d'un seul pool plasmatique homogène d'apoC-III totalement libre d'interchanger entre les différents types de lipoprotéines est actuellement privilégiée (282).

2.1.2 Rôle métabolique

La principale fonction physiologique de l'apoC-III serait d'inhiber l'action de la lipase lipoprotéique (LPL), la principale enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides plasmatiques et de la clairance des LRT (283-285). L'apoC-III pourrait aussi nuire à la liaison des LRT avec les glycosaminoglycans qui tapissent l'endothélium vasculaire et nuirait ainsi à leur interaction avec la LPL (286) de même qu'avec les récepteurs hépatiques dépendants de l'apoE responsables de leur élimination (271, 287). En accord avec ces caractéristiques physiologiques, les concentrations plasmatiques d'apoC-III ont été fortement et directement associées aux concentrations plasmatiques de triglycérides autant chez les individus normaux (268) que chez les diabétiques de type 2 (288). L'étroite relation unissant l'apoC-III à la triglycéridémie est également appuyée par le fait que les individus ayant un défaut d'expression du gène de l'apoC-III montrent systématiquement

des concentrations plasmatiques réduites de triglycérides, et une activité lipolytique plasmatique augmentée (283, 289, 290). De façon similaire, la surexpression du gène humain de l'apoC-III chez la souris résulte en une augmentation dramatique des concentrations plasmatiques de triglycérides et une accumulation de VLDL en circulation (291). À l'inverse, en accord avec les observations chez l'humain, la suppression du gène analogue de l'apoC-III chez la souris entraîne une diminution marquée de la triglycéridémie et une augmentation de l'hydrolyse des VLDL et protégerait contre le développement de l'hypertriglycéridémie due au diabète (292, 293). Fait intéressant, une étude réalisée par Duivenvoorden et coll. suggère que l'absence d'apoC-III chez la souris pourrait stimuler le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline en lien avec la consommation d'une diète riche en lipides. En effet, ceux-ci ont noté qu'en absence d'apoC-III, une diminution des concentrations plasmatiques de triglycérides de 60% était associée à une prise en charge élevée des triglycérides au niveau adipeux menant à un gain de poids de 22 % supérieur aux souris témoins exprimant normalement le gène de l'apoC-III. Ce gain de poids était associé à une perte de sensibilité à l'insuline de l'ordre de 43% alors que la suppression de la production de glucose hépatique en réponse à l'insuline était réduite de 25% chez les souris apoC-III \neg (294). Il est cependant important de noter qu'une prise alimentaire supérieure de 15% a été observée chez les souris apoC-III \neg et que les auteurs ne font pas mention de la dépense énergétique des animaux, ce qui permet de douter que la prise de poids supplémentaire des souris apoC-III \neg s'explique uniquement par la suppression du gène de l'apoC-III. Cette étude montre toutefois l'importance physiologique que pourrait avoir l'apoC-III en régulant le flux d'acides gras au niveau des différents tissus et en protégeant contre la détérioration métabolique que pourrait induire un apport excessif de triglycérides.

En plus de son rôle prédominant comme modulateur de la triglycéridémie, l'apoC-III pourrait nuire à l'action de la *lecithin-cholesterol acyl transferase* (LCAT) en limitant son accès aux lipoprotéines (295). La LCAT est une enzyme qui favorise la maturation des HDL par l'estérification du cholestérol libre présent à la surface des HDL. Le cholestérol estérifié étant plus hydrophobe, celui-ci migre au centre des lipoprotéines et favorise la captation de nouvelles molécules de cholestérol libre par les HDL (296). Cette propriété de l'apoC-III devra cependant être validée.

2.1.3 ApoC-III et MCV

En raison de son implication mécanistique probable dans le développement de l'hypertriglycéridémie, l'apoC-III pourrait jouer un rôle important dans l'étiologie du syndrome métabolique et dans la détérioration du profil de risque de MCV et de diabète de type 2. Cette hypothèse est présentement supportée par plusieurs études cliniques et prospectives (297) ayant observé le potentiel des concentrations plasmatiques d'apoC-III à prédire le risque de MCV et la progression de la maladie coronarienne indépendamment des concentrations plasmatiques de LDL-C (268, 298, 299) ou de triglycérides (300). La plus importante de ces études, menée par Scheffer et coll. chez plus de 2200 individus sur 15 ans, démontra que les concentrations plasmatiques d'apoC-III étaient associées de façon prospective à la MCV (rapport de risque entre le 4^e et le 1^{er} quartile de la distribution : 1.85 [IC 95% : 1.02-3.38]), indépendamment de l'âge, du sexe, de la triglycéridémie et des facteurs de risque traditionnels (301). Chez des patients diabétiques en prévention secondaire, les concentrations de LDL contenant l'apoC-III ont été associées au risque d'événement coronarien, indépendamment du profil lipidique et de l'apoB-100 (RR 6.6, $P < 0.0001$, 4^e vs 1^{er} quartile), suggérant que l'apoC-III pourrait s'avérer un marqueur important de l'athérogénicité des LDL chez ce type de patients (302).

2.1.4 ApoC-III et syndrome métabolique

Malgré son rôle très probable dans le développement de la dyslipidémie athérogène, peu d'études épidémiologiques ont examiné le potentiel des concentrations plasmatiques d'apoC-III à identifier les individus atteints du syndrome métabolique. Une étude transversale menée par Onat et coll. (268) chez plus de 800 hommes et femmes a démontré une prévalence 4.66 fois plus élevée (IC 95% 3.43–6.32) du syndrome métabolique chez les individus montrant des concentrations plasmatiques élevées d'apoC-III au niveau des VLDL (> 70 mg/l) comparativement à ceux montrant des concentrations relativement basses (< 48 mg/l). Les auteurs ne mentionnaient toutefois pas l'origine des valeurs limites de concentrations d'apoC-III utilisées lors des analyses statistiques. Des résultats similaires ont été obtenus par Olivieri et coll. lors d'une autre étude transversale menée chez plus de 800 hommes et femmes, où une prévalence 6 fois plus élevée du syndrome métabolique a été observée entre les 1^{er} et 4^e quartiles de la population pour les concentrations

plasmatiques d'apoC-III, indépendamment de l'âge, du sexe, des concentrations plasmatiques de cholestérol, d'apoB-100, de triglycérides et des autres facteurs de risque du syndrome métabolique (269). Aucune étude épidémiologique n'a cependant encore évalué le potentiel des concentrations plasmatiques d'apoC-III à définir le profil de risque de diabète de type 2. Toutefois, des concentrations élevées d'apoC-III ont été observées de façon répétée chez les obèses et dans le contexte de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (194, 280, 288).

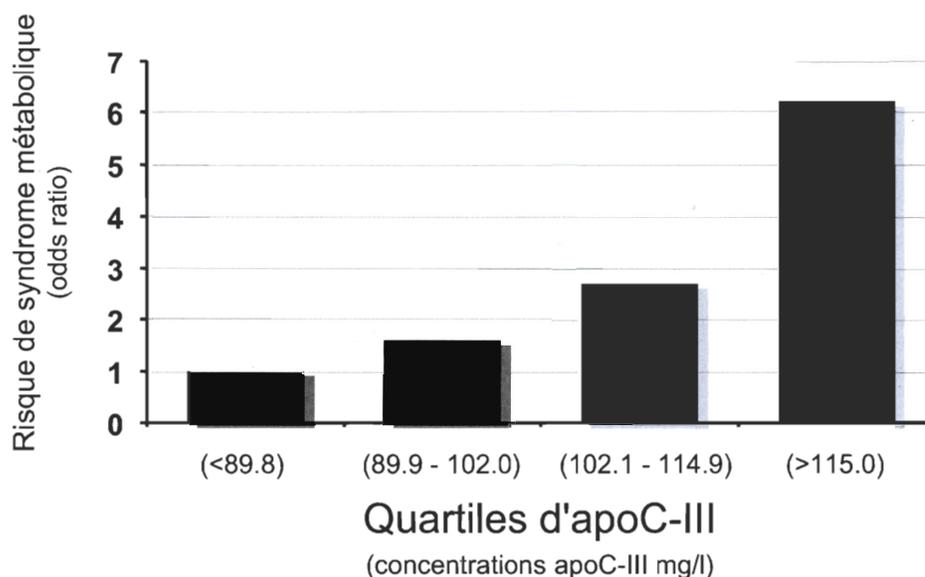


Figure 2.1 : Relation entre les concentrations plasmatiques d'apoC-III et le risque de syndrome métabolique. Tiré de l'étude de Olivieri et coll. (269).

À la lumière de ces observations, il apparaît évident que les concentrations plasmatiques d'apoC-III pourraient fournir une information clinique pertinente sur le statut métabolique et le profil de risque de MCV. De même, l'association étroite entre les concentrations plasmatiques d'apoC-III et la prévalence du syndrome métabolique suggère que l'apoC-III pourrait aussi être un indicateur important du risque de diabète de type 2, malgré l'absence de données épidémiologiques supportant cette hypothèse.

2.1.5 Facteurs influençant les concentrations plasmatiques d'apoC-III

L'expression du gène de l'apoC-III serait réprimée, en partie, par l'insuline via un élément de réponse à l'insuline situé en amont du gène (303, 304), ce qui pourrait contribuer à expliquer les concentrations élevées d'apoC-III observée chez les individus obèses, résistants à l'insuline et les diabétiques de type 2. L'activation de PPAR α serait également associée à une atténuation de l'expression du gène de l'apoC-III, en accord avec le fait que le traitement aux fibrates induit une diminution significative de l'apoC-III en circulation (305, 306). Enfin, les interventions pharmacologiques et nutritionnelles ayant un impact bénéfique sur la triglycéridémie ont généralement une répercussion favorable sur les concentrations plasmatiques d'apoC-III, démontrant encore une fois le lien intime unissant les concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoC-III (297, 307). Il est toutefois très intéressant de noter que certaines données scientifiques suggèrent qu'un des déterminants majeurs des concentrations plasmatiques d'apoC-III pourrait tout simplement être le nombre de particules lipoprotéiques en circulation (LRT et HDL confondus). En effet, autant l'infusion d'acides gras libres (152) que d'HDL immatures (308), qui favorise respectivement l'augmentation du nombre de LRT et de HDL en circulation, stimule efficacement l'augmentation des concentrations plasmatiques d'apoC-III.

Des études supplémentaires devront obligatoirement être réalisées afin d'élucider les mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation de l'apoC-III ainsi que pour établir le rôle de cette dernière dans le métabolisme énergétique.

2.1.6 Isoformes de l'apoC-III : origines et impact métabolique

En circulation, l'apoC-III se présente sous trois isoformes qui se distinguent par le degré de sialylation du résidu thréonine en position 74. L'apoC-III₀, l'isoforme la moins représentée, n'est pas glycosylée et ne contient aucune molécule d'acide sialique. L'apoC-III₁, l'isoforme la plus abondante, et l'apoC-III₂ sont toutes deux glycosylées et contiennent respectivement une et deux molécules d'acide sialique (297, 309). Les mécanismes régulant la sialylation de l'apoC-III sont largement méconnus. Roghani et Zannis, ont observé en culture cellulaire que seul l'apoC-III₂ était sécrétée, suggérant que les isoformes non-sialilée et mono-sialylée devaient provenir de modifications enzymatiques suivant

l'excrétion du peptide (310). Toutefois, la désialylation des protéines sialylées n'a pu être observée en circulation in vivo chez l'humain (311) probablement en raison du fait que la neuraminidase, l'enzyme lysosomale catalysant la désialylation des protéines, ne serait que très faiblement active à pH neutre (312). Enfin, la glycosylation et la sialylation de l'apoC-III ne semblent pas requises ni pour l'excrétion du peptide en circulation, ni pour sa liaison aux différentes lipoprotéines (310). Ces observations, bien qu'elles ne fournissent que peu d'information sur l'origine même des différents isoformes de l'apoC-III, suggèrent que celles-ci ne seraient pas générées en circulation. Des études seront donc nécessaires afin de déterminer si la sialylation intracellulaire de l'apoC-III précédant sa sécrétion est régulée d'une quelconque façon par des mécanismes encore inconnus.

La pertinence du degré de sialylation de l'apoC-III sur son activité métabolique est également relativement obscure. Malgré qu'il ait été démontré que la désialylation complète des VLDL n'influence pas leur métabolisme in vitro (313), deux études observèrent une prédominance d'apoC-III₂ associé aux LRT chez des individus présentant une hypertriglycémie sévère (314, 315). L'activité lipolytique plasmatique était significativement diminuée chez ces individus comparativement au plasma d'individus hypertriglycémiques présentant un profil normal d'apoC-III. L'incubation des LRT enrichies en apoC-III₂ en présence de neuraminidase permit de normaliser l'activité lipolytique plasmatique de ces individus. De même, une intervention nutritionnelle visant la correction de la triglycémie, mais dont la composition en macro-nutriments n'était pas mentionnée permit aussi de normaliser le profil en apoC-III et de rétablir l'activité lipolytique plasmatique (315). Une étude in vitro plus récente a quant à elle démontré que l'affinité de l'apoC-III₂ pour les VLDL serait deux fois supérieure à celle de l'apoC-III₀ et de l'apoC-III₁ (271). La même étude montra également cependant que l'apoC-III₂ présentait un potentiel réduit d'inhibition de la liaison des LRT au récepteur stimulé par la lipolyse (*lipolysis-stimulated receptor*).

Ces observations suggèrent que le degré de sialylation de l'apoC-III pourrait potentiellement influencer le métabolisme in vivo des triglycérides. Les études cliniques qui ont examiné le rôle de l'apoC-III dans l'étiologie du syndrome métabolique ont jusqu'à maintenant ignoré la distribution des divers isoformes de l'apoC-III. Ainsi, l'hypothèse

d'un rôle différentiel de chacune des isoformes de l'apoC-III sur le métabolisme lipidique n'a jamais été testée et mérite d'être approfondie.

2.2 Hétérogénéité des LDL

Une autre anomalie physiologique étroitement liée au syndrome métabolique consiste en la présence accrue de LDL de diamètre réduit en circulation. Les LDL constituent une classe hétérogène de lipoprotéines en termes de dimension et de contenu. Cette hétérogénéité a été grandement étudiée au cours des dernières années et est intimement liée au métabolisme intravasculaire des lipoprotéines. Cette section résume les connaissances actuelles du métabolisme des lipides, des lipoprotéines et des mécanismes physiologiques responsables de l'hétérogénéité des LDL en termes de diamètre et de densité. Les facteurs appuyant l'athérogénicité accrue des LDL petites et denses dans le développement de la plaque athéromateuse seront également revus.

2.2.1 Structure et classes de lipoprotéines

Le cholestérol et les triglycérides sont des molécules hydrophobes devant être transportées dans le plasma, un milieu aqueux. Ainsi, ces composés sont véhiculés à l'intérieur de lipoprotéines, des complexes particuliers hydrosolubles présentant une surface composée de lipides amphipathiques (phospholipides, cholestérol non-estérifié et apolipoprotéines) recouvrant un noyau composé majoritairement de lipides non-polaires (triglycérides et cholestérol estérifié). On distingue deux systèmes lipoprotéiques majeurs, celui associé au transport des lipides d'origine exogène et celui associé au transport des lipides d'origine endogène (316).

Les chylomicrons sont assemblés et sécrétés par les entérocytes, contiennent une molécule d'apoB-48 par particule, sont responsables du transport des triglycérides et du cholestérol exogènes et sont constitués majoritairement de triglycérides lors de leur synthèse (317). Sous l'action des différentes lipases vasculaires, principalement de la LPL, les chylomicrons perdent jusqu'à 80% de leur contenu en triglycérides. Les résidus de chylomicrons acquièrent les apo C et E en circulation, ce qui permet leur élimination par

endocytose au niveau du foie, principalement via la protéine reliée au récepteur des LDL (LDL-receptor related protein) et via le récepteur hépatique des LDL (318).

Les VLDL sont assemblées et sécrétées par les hépatocytes, contiennent une molécule d'apoB-100 par particule et sont responsables du transport des triglycérides et du cholestérol synthétisés au foie (319). La lipase lipoprotéique est responsable de l'hydrolyse d'environ 80% des TG des VLDL, mais les lipoprotéines résiduelles ne sont pas systématiquement éliminées de la circulation. Environ 50 à 70% de celles-ci sont subséquemment modifiées par la lipase hépatique, une lipase capable d'hydrolyser les triglycérides et les phospholipides de surface des lipoprotéines, pour générer les LDL.

2.2.3 LDL-cholestérol et MCV

Chez un individu en santé, les LDL transportent 60 à 70 % du cholestérol plasmatique. Celles-ci sont éliminées principalement par le récepteur des LDL, exprimé par l'ensemble des cellules du corps humain, mais dans une plus grande proportion au niveau du foie (320). Le diamètre réduit des LDL, contrairement au VLDL, leur permettrait de diffuser à travers la paroi artérielle sans l'aide de récepteurs, ce qui pourrait mener à leur séquestration en certains foyers de la vasculature propices à l'infiltration des lipoprotéines (316). La rétention prolongée des LDL dans la matrice extracellulaire entraînerait la production de lipides oxydés (321) pouvant déclencher l'activation du facteur nucléaire NF- κ B (322-324) qui induirait à son tour l'expression des molécules d'adhésion ICAM-I, VCAM-I et E-sélectine par les cellules endothéliales. L'infiltration des monocytes dans la paroi vasculaire mènerait à la formation de cellules spumeuses, au développement d'un noyau nécrotique et à la déposition de cholestérol cristallisé (325). De l'étape de la strie lipidique à celle de la plaque mature, le cholestérol représenterait 80 % des lipides de la lésion (326). L'implication directe du cholestérol dans l'étiologie de l'athérosclérose explique donc pourquoi la relation unissant les concentrations plasmatiques de cholestérol et la mortalité due à la MCV est extrêmement bien documentée.

2.2.4 Hétérogénéité des LDL et MCV

Les LDL constituent une classe de lipoprotéines hétérogènes en termes de taille et de propriétés physico-chimiques. L'électrophorèse sur gel non dénaturant a permis de démontrer que les LDL semblent se répartir en un certain nombre de sous-classes de taille homogènes plutôt que de montrer une distribution continue (327). La présence de LDL denses a été observée de façon répétée dans le contexte du syndrome métabolique, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (328-333) et leur prévalence en circulation tendrait à augmenter avec l'accumulation des composantes du syndrome métabolique (330). Plusieurs études épidémiologiques prospectives ont démontré qu'une augmentation de la proportion de LDL petites et denses en circulation serait associée à un risque de MCV augmenté de trois à sept fois, ce qui pourrait contribuer, en partie, à l'augmentation du risque de MCV associé au syndrome métabolique (334-338). Des données récentes suggèrent que la quantité absolue de LDL denses circulantes serait un meilleur indicateur du risque de MCV et de la progression athérosclérotique sous-jacente que la distribution relative des LDL vers des densités plus élevées (338-340). Ces observations seraient concordantes avec le fait que les concentrations plasmatiques d'apoB-100, un indice du nombre de particules athérogènes circulantes, seraient étroitement reliées à la MCV dans le contexte du syndrome métabolique (196, 197, 341).

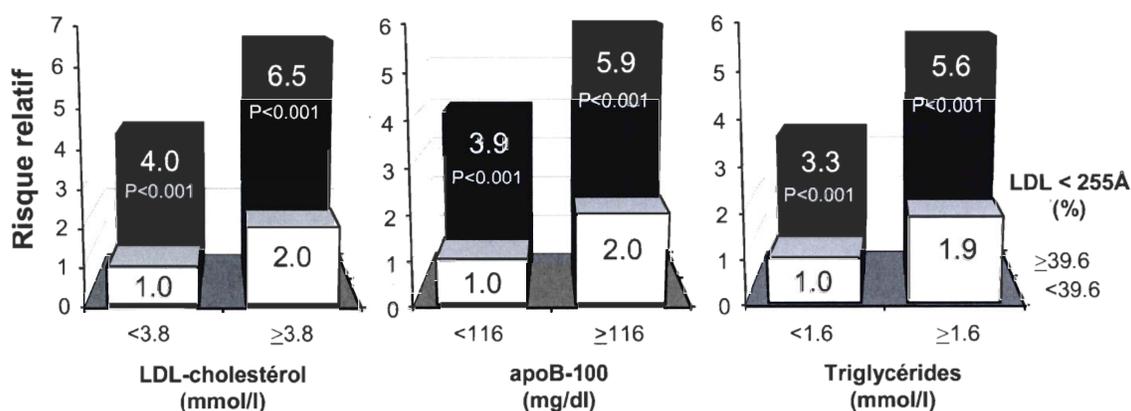


Figure 2.2 : Risque relatif d'événement cardiovasculaire en lien avec les concentrations plasmatiques inférieures ou supérieures à la concentration médiane de LDL-cholestérol, d'apoB-100, de triglycérides et la proportion médiane de LDL denses circulantes. Le risque relatif était ajusté pour l'âge, l'indice de masse corporelle, la pression artérielle, la présence de diabète de type 2, l'histoire familiale de MCV et l'usage de produits du tabac. Tiré de (338).

De fortes concentrations de LDL denses en circulation sont cependant souvent observées de façon concomitante à la présence de concentrations plasmatiques élevées de triglycérides et d'apoB-100 et de concentrations plasmatiques réduites de HDL-C, tous d'importants facteurs de risque indépendants de la MCV (330, 342). Ainsi, l'indépendance de la relation entre les LDL denses et l'incidence de la MCV, testée statistiquement par l'utilisation de modèles multivariés, est encore vivement débattue (342-344). En dépit de ces considérations statistiques, le potentiel athérogénique supérieur des LDL de densités élevées est appuyé par les études *in vitro* ayant démontré leur affinité réduite pour le récepteur LDL (345, 346), leur affinité accrue pour la matrice extracellulaire (345), leur protection antioxydante réduite (347, 348) et par les études *in vivo* ayant démontré leur temps de résidence prolongé en circulation (349-351). Ces caractéristiques des LDL denses favoriseraient leur participation au processus athérosclérotique et pourraient contribuer de façon importante à la détérioration du profil de risque de MCV observée dans le contexte du syndrome métabolique.

2.2.5 Hétérogénéité des LDL : origine métabolique

La taille des LDL est déterminée principalement par leur contenu en cholestérol. Étant donnée l'absence d'enzymes plasmatiques capables d'hydrolyser le cholestérol estérifié, la déplétion lipidique des LDL doit impliquer un transfert du cholestérol estérifié (327). Ainsi, Packard et coll., pour expliquer la formation des différentes sous-classes de LDL, ont suggéré que le contenu en cholestérol des LDL serait modulé par l'action combinée de la CETP et de la lipase hépatique (208, 211, 327). Tout comme pour l'enrichissement en triglycérides des HDL décrit dans la section 1.4.3, la CETP serait responsable de la déplétion du noyau lipidique des LDL en supportant l'échange d'esters de cholestérol provenant des LDL en retour de triglycérides véhiculés par les LRT (352). Les LDL enrichies en triglycérides seraient ensuite soumises à l'action de la lipase hépatique qui catalyserait l'hydrolyse du noyau lipidique et des phospholipides de surface des LDL (353-355). Ces processus de transfert et d'hydrolyse successifs mèneraient à la réduction de la taille des LDL (352). L'activité de la CETP ne serait pas limitante dans le processus de transfert lipidique entre les fractions lipoprotéiques et dépendrait principalement du

gradient de substrats échangeables (356, 357). En revanche, l'activité de la lipase hépatique a été positivement associée aux concentrations de LDL denses chez l'homme (358). Ce modèle serait concordant avec l'association bien documentée unissant les concentrations plasmatiques de triglycérides et de LDL denses (334, 335, 359-361).

Kraus et Berneiss, quant à eux, ont complexifié ce modèle en y intégrant leur hypothèse suggérant que la sécrétion hépatique de différentes espèces lipoprotéiques générerait différentes espèces de LDL (362). Définissant quatre classes de LDL (de LDL-I à LDL-IV, LDL-IV étant la plus dense), ceux-ci observèrent lors d'une intervention nutritionnelle que les concentrations de LDL-I et LDL-III variaient de façon réciproque, de même que les concentrations de LDL-II et LDL-IV (363). Ceux-ci proposèrent donc que les LDL-I et III pourraient provenir de précurseurs lipoprotéiques dont la production serait coordonnée de façon réciproque au foie et qu'il en serait de même pour les LDL-II et LDL-IV. Les mécanismes moléculaires responsables de la régulation et de la sécrétion des différentes espèces lipoprotéiques du modèle de Krauss et Berneiss sont inconnus. Cependant, leur modèle hypothétique spécifie que plus les précurseurs lipoprotéiques seraient enrichis en triglycérides, plus ceux-ci seraient susceptibles de générer directement, par l'action des lipases, des LDL de densité élevée (362). Les individus hypertriglycéridémiques se différencient principalement des individus normolipidémiques par leurs concentrations accrues de VLDL particulièrement riches en triglycérides (178, 350), le modèle de Krauss et Berneiss serait donc lui aussi concordant avec l'hypothèse du rôle prédominant de l'hypertriglycéridémie dans la formation des LDL denses.

Ainsi, ces modèles, principalement basés sur des analyses de corrélation et d'observations statiques, supportent tous deux le rôle important de la triglycéridémie dans l'origine métabolique de l'hétérogénéité des LDL. Toutefois, le métabolisme des lipoprotéines est un processus dynamique et très peu d'études se sont attardées à examiner *in vivo* les interrelations entre les classes de lipoprotéines menant à la formation des différentes sous-classes de LDL. De ce fait, le métabolisme intravasculaire des différentes sous-classes de LDL en fonction de leur diamètre et en réponse aux autres facteurs de risque du syndrome métabolique est encore largement inconnu.

2.3 Protéine C-réactive

Le rôle prépondérant de la réponse inflammatoire à tous les stades de l'athérosclérose est largement accepté. L'adhésion et l'infiltration des monocytes au site de séquestration des lipoprotéines athérogènes dans la paroi vasculaire, la lente évolution de la plaque athéromateuse, l'événement thrombotique et finalement la nécrose du myocarde résultant de l'ischémie sont toutes des étapes où l'inflammation jouerait un rôle majeur (364-366). La stabilité de la plaque athéromateuse, un déterminant important du risque de rupture et d'événement thrombotique, est grandement déterminée par son activité inflammatoire (7, 367). Plusieurs éléments enzymatiques de la réponse inflammatoire, comme les métalloprotéinases de la matrice (matrix metalloproteinase, MMP), pourraient fragiliser la structure de la plaque, facilitant sa rupture et la libération des composantes thrombotiques du noyau nécrotique (368, 369). Incidemment, l'utilisation potentielle des concentrations plasmatiques de marqueurs inflammatoires dans l'estimation du profil de risque de MCV a grandement suscité l'intérêt scientifique au cours des deux dernières décennies. À ce titre, la protéine C-réactive (C-reactive protein, CRP), une protéine depuis longtemps associée à la réponse inflammatoire non spécifique, a particulièrement attiré l'attention (145).

2.3.1 Physiologie de la CRP

La CRP est une protéine plasmatique constituée de 5 monomères associés de façon non covalente (370). Son nom provient de son affinité importante pour le polysaccharide-C dérivé de certains pneumocoques pathogènes (371). La présence d'ions calcium est critique pour la préservation de l'intégrité moléculaire de la CRP (372) ainsi que pour sa liaison à ses multiples ligands naturels comme la phosphocholine (373), les phospholipides oxydés (374), les lipoprotéines modifiées (375), les débris de cellules nécrosées (376) et certaines protéines ribonucléiques (377). Un peu à la façon des anticorps, la liaison de la CRP à ses différents ligands entraîne leur précipitation et l'activation de la voie du complément *in vivo* (378). La CRP montre une préservation évolutive et phylogénique surprenante, ce qui laisse croire que son rôle physiologique serait probablement bénéfique (379, 380). Les différents ligands et la capacité d'activer la voie du complément de la CRP humaine supportent l'hypothèse que celle-ci pourrait jouer un rôle dans l'immunité non spécifique et

l'élimination des débris cellulaires (145). Toutefois, la fonction physiologique de la CRP est encore inconnue (145, 381).

Chez l'humain, la concentration plasmatique médiane de CRP dans la population générale est d'environ 1 mg/l (382-385). La CRP est synthétisée et éliminée principalement au foie (386, 387) et son expression est finement régulée par différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α (388-390). Suite à la liaison de l'IL-6 à son récepteur, IL-6R α , ce dernier forme un complexe avec la molécule de transduction de signal gp130. Le complexe IL-6R α /gp130 induirait la phosphorylation et l'activation des kinases JAK, qui à leur tour mènerait à l'activation des facteurs C/EBP β et STAT3, responsable de l'expression du gène de la CRP (391). Lors de la réponse inflammatoire aiguë, les concentrations plasmatiques de CRP augmentent dramatiquement, atteignant des valeurs 100 à 1000 fois supérieures aux concentrations basales, pour rapidement revenir à la normale suivant la résorption du stimulus inflammatoire (145). Ces dernières caractéristiques de la CRP en font un marqueur idéal de l'activité inflammatoire chez les patients hospitalisés (392). La complète non-spécificité de la CRP fait toutefois en sorte que le moindre stress non physiologique mènerait à une augmentation significative de ses concentrations plasmatiques (393). Néanmoins, l'observation de la présence de CRP dans les lésions d'infarctus du myocarde chez l'humain à l'aide de méthodes immunohistochimiques (365, 394) menèrent certains à émettre l'hypothèse que la CRP pourrait jouer un rôle important dans la pathophysiologie de l'athérosclérose et que ses concentrations plasmatiques pourraient être utilisées en clinique dans l'estimation du profil de risque de MCV.

2.3.2 CRP et MCV

Au début des années 1980, de Beer et coll. montrèrent que la persistance de concentrations élevées de CRP suite à un événement coronarien aigu était associée à un mauvais pronostic (395). L'avènement des méthodes de mesure automatisées et hautement sensibles de la CRP permit de démontrer dans *l'Étude prospective européenne sur les facteurs de coagulation comme marqueurs du pronostic des patients atteints d'angine stable et instable* que des concentrations plasmatiques CRP relativement élevées prédisaient

significativement l'incidence des événements coronariens (396, 397). Dans la seconde moitié des années 1990 et au début des années 2000, plusieurs grandes études prospectives, notamment les études WOSCOP (398), Women's Health Study (WHS) (399), MRFIT (400), AFCAPS/TEXCAPS (401), Physician Health Study (402) et MONICA (403) vinrent corroborer le potentiel des concentrations plasmatiques de CRP à prédire le risque de MCV. Ces premières études rapportaient en moyenne un risque relatif de MCV deux à trois fois plus élevé chez les individus montrant des concentrations plasmatiques de CRP supérieures à 3.0 mg/l comparativement aux individus présentant des concentrations inférieures à 1 mg/l, indépendamment des facteurs de risque traditionnels (404). Certains, notamment Ridker et coll., ont même montré que la CRP fournissait une information clinique plus complète, ou du moins complémentaire aux concentrations plasmatiques de cholestérol LDL (399) et à l'algorithme de Framingham (405) dans l'estimation du risque de MCV. Chacune de ces études recensait cependant relativement peu d'événements cliniques vasculaires (moins de 300 dans la plupart des cas (400-403)). Les plus récentes études, qui comptent un nombre beaucoup plus élevé de cas cliniques, ont associé les concentrations plasmatiques de CRP élevées à un risque relatif de MCV ajusté pour la présence des facteurs de risque traditionnels considérablement atténué comparativement aux études initiales (RR ~1.5) (404, 406). Il n'en demeure pas moins que les concentrations plasmatiques de CRP continuent d'être significativement associées à l'incidence de la MCV et pourraient donc se révéler un outil pratique dans l'évaluation clinique du profil de risque de MCV.

2.3.3 CRP et syndrome métabolique

L'idée qu'une composante pro-inflammatoire soit étroitement associée au syndrome métabolique est de plus en plus largement acceptée, particulièrement depuis les observations d'Hotamisligil et coll. qui permirent de démontrer l'implication du TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline en contexte d'obésité (69, 70). Dans la même veine, des concentrations plasmatiques élevées de CRP ont été observées de façon répétée dans le contexte de l'obésité (407-410), de l'hypertriglycémie (411), du syndrome métabolique (412, 413), de la résistance à l'insuline (414-416) et du diabète de type 2 (409, 417). De même, des études transversales ont démontré que les concentrations

plasmatiques de CRP sont corrélées à l'accumulation des facteurs de risque du syndrome métabolique (414, 418). Le degré d'adiposité semblerait toutefois être le principal déterminant des concentrations de CRP circulantes dans les études de population (412, 419) et dans le contexte du syndrome métabolique (420). Cette association est appuyée par les observations montrant que la perte de poids chez les diabétiques de type 2 et les individus résistants à l'insuline serait associée à une diminution significative des niveaux de CRP en circulation (421-423). Les mécanismes responsables de la forte association entre les concentrations plasmatiques de CRP et le degré d'adiposité sont encore mal compris, mais pourraient impliquer la canalisation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α en provenance du tissu adipeux viscéral vers le foie, ce qui stimulerait potentiellement la production hépatique de CRP (388-390).

Fait intéressant, des données provenant des études WHS et WOSCOP suggèrent que l'information clinique apportée par la mesure des concentrations plasmatiques de CRP serait additive à l'information fournie par les facteurs de risque du syndrome métabolique dans l'estimation de risque de MCV. L'analyse des données de la WHS, qui regroupait près de 15 000 femmes suivies sur 8 ans, démontra que les femmes qui montraient des concentrations plasmatiques de CRP élevées en plus d'être atteintes du syndrome métabolique étaient significativement plus à risque de MCV que celles montrant des concentrations plasmatiques élevées de CRP isolées et celles atteintes du syndrome métabolique, mais présentant des concentrations plasmatiques faibles de CRP (**figure 2.3**, panneau gauche) (418). L'analyse des données de l'étude WOSCOP, qui regroupait près de 6500 hommes suivis sur 5 ans, montra de façon similaire que le risque relatif de MCV était significativement plus élevé chez les hommes atteints du syndrome métabolique et montrant des concentrations plasmatiques élevées de CRP que chez les individus montrant aucun ou un seul de ces facteurs de risque (**figure 2.3**, panneau droite) (30).

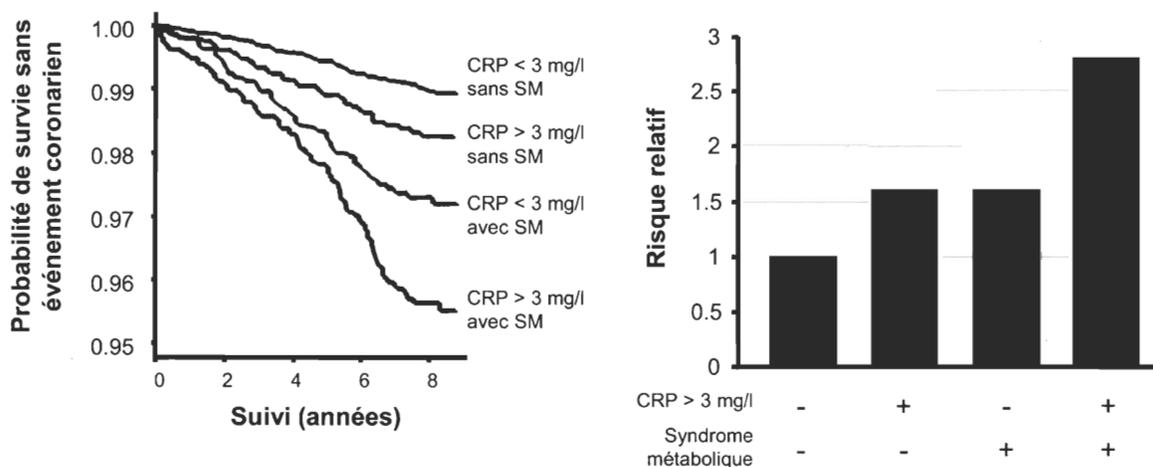


Figure 2.3 : Probabilité de survie sans événement coronarien chez 14 719 femmes américaines (panneau de gauche) et risque relatif d'événement coronarien chez 6447 hommes (panneau de droite) en fonction des concentrations plasmatiques de CRP et du syndrome métabolique (30, 418).

Ces deux études ont aussi démontré la capacité des concentrations plasmatiques de CRP à prédire le risque de diabète de type 2. Dans l'étude WHS, les femmes dont les concentrations de CRP étaient dans le 4^e quartile de la distribution étaient 4 fois plus à risque de diabète de type 2 (RR 4.2, IC 95% : 1.2 -12) que celles dont les concentrations étaient dans le 1^{er} quartile de la distribution, indépendamment de l'indice de masse corporelle, de l'histoire familiale de diabète et du niveau d'activité physique (424). Dans l'étude WOSCOP, le risque de diabète de type 2 augmentait graduellement et significativement à travers les différents quintiles de concentrations de CRP, de façon à ce que les individus situés dans le 5e quintile (CRP>4.18 mg/l) étaient 3 fois plus à risque de diabète que les individus situés dans le premier quintile (HR 3.03, IC 95% 1.33 - 7.10) (425). Le potentiel des concentrations plasmatiques de CRP à prédire le risque de diabète de type 2 fut aussi observé dans les études Cardiovascular Health Study (426), MONICA (427), Insulin Resistance Atherosclerosis Study (428) et de la Nurses Health Study(429).

La capacité de la CRP à compléter les critères du syndrome métabolique dans l'estimation du profil de risque de MCV et de diabète amena la suggestion que les concentrations de CRP pourraient être incluses parmi les facteurs de risque officiels du

syndrome (430). Ces observations menèrent aussi à suspecter un rôle direct de la CRP dans l'étiologie de l'athérosclérose.

2.3.4 Hypothèse de l'implication directe de la CRP dans la pathophysiologie de la MCV

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* chez des modèles animaux furent entreprises afin d'élucider la participation active de la CRP dans le développement de l'athérosclérose. Plusieurs des études initiales démontrant *in vitro* l'activité pro-inflammatoire de la CRP ont été remises en question par l'utilisation non contrôlée de CRP recombinante d'origine bactérienne, possiblement contaminée par des endotoxines ou des substances bactériostatiques (NaN_3) (431-435). Les conclusions provenant d'études de modèles animaux comme le rat et la souris sont aussi passablement mitigées. Toutefois, une des plus rigoureuses de ces études mit à profit la capacité qu'a la CRP d'origine humaine d'activer la voie du complément chez le rat, capacité que ne semble pas avoir l'analogue de la CRP exprimée chez le rat (436). L'injection quotidienne de doses massives de CRP humaine hautement purifiée chez des rats ayant subi une ligature des artères coronariennes eut pour effet d'exacerber le développement de l'athérosclérose (437). L'injection de CRP humaine n'eut cependant aucun effet chez les rats n'ayant pas subi la ligature des artères coronariennes. Ces observations, bien que provenant d'un modèle animal, sont en accord avec le fait que des concentrations élevées de CRP seraient associées à un mauvais pronostic dans un contexte d'événement coronarien aigu, mais que la CRP en soit ne semblerait pas accélérer le processus athérosclérotique en absence de traumatisme coronarien sévère.

Un certain nombre d'études *in vitro* ont également été réalisées à nouveau en contrôlant adéquatement pour la présence possible de contaminants pro-inflammatoires (438). Ces études suggèrent entre autres que la CRP serait en mesure de promouvoir l'expression de molécules d'adhésion (439, 440), la dysfonction endothéliale par inhibition de l'enzyme eNOS (441, 442), l'activation des macrophages (443) et l'expression accrue des métalloprotéinases de la matrice (444, 445). Toutefois, la plupart de ces observations ont été obtenues par l'incubation de cultures cellulaires en présence de concentrations de CRP beaucoup plus élevées (>10 mg/l) que les valeurs de concentrations fournissant une

information clinique pertinente en termes de risque cardiovasculaire (<10 mg/l) (446). Ces observations laissent donc planer le doute quant à une implication réelle et directe de la CRP à des concentrations pertinentes (entre 3.0 et 10.0 mg/l) dans la progression de l'athérosclérose.

Le fait qu'aucun traitement nutritionnel ou pharmacologique connu ne module spécifiquement les concentrations plasmatiques de CRP sans influencer simultanément un ou plusieurs autres facteurs de risque de MCV contribue à alimenter l'intense débat entourant le rôle de la CRP dans le développement de la MCV *in vivo* chez l'humain. Cependant, l'association entre l'inflammation chronique de faible intensité et l'incidence de la MCV est supportée par la quasi-totalité des grandes études épidémiologiques. À la lumière de ces observations, on peut penser que les concentrations plasmatiques élevées de CRP pourraient simplement être le reflet d'un certain degré de détérioration métabolique globale qui rendrait l'organisme plus sensible aux autres facteurs de risque de MCV tout en handicapant sa capacité à faire face correctement à certains traumatismes sévères comme l'événement coronarien aigu. Cette hypothèse serait appuyée par les résultats d'une récente étude ayant démontré chez quatre grandes cohortes indépendantes que les individus ayant des concentrations plasmatiques élevées de CRP en raison d'un polymorphisme au niveau du gène de la CRP ne seraient pas à risque accru de MCV (406). Des études supplémentaires très bien contrôlées permettant éventuellement d'isoler la contribution spécifique de la CRP à l'augmentation de risque de maladie coronarienne chez l'humain devront cependant être réalisées afin de valider cette hypothèse.

Chapitre 3. Cinétique des protéines

Les concentrations plasmatiques de LDL petites et denses, d'apoC-III, de CRP et de tout autre facteur de risque du syndrome métabolique sont des valeurs statiques qui en disent peu sur les mécanismes physiologiques responsables de leur expression in vivo. Du point de vue physiologique, ces facteurs de risque servent à décrire une condition métabolique associée à un risque de MCV élevé. Cette condition constitue un état stable où les concentrations des différents facteurs de risque sont définies par la somme de processus anaboliques et cataboliques. L'amélioration des méthodes de prévention et de traitement de la MCV repose largement sur la compréhension des changements mécanistiques qui s'opèrent lors du passage d'une condition associée à un faible risque de MCV à celle associée à un haut risque de MCV. Les études de cinétique à l'aide de traceurs constituent actuellement la méthode de référence pour l'exploration de ces changements mécanistiques et physiologiques (447). Les prochaines sections ont pour but de présenter certains aspects de la méthodologie des études cinétiques. Une attention particulière sera apportée à l'explication du traitement et de l'analyse des données de cinétique par modélisation mathématique. Lorsque requis, le métabolisme des lipoprotéines sera utilisé pour illustrer certains concepts. Les concepts pertinents à l'étude de la cinétique des protéines seront privilégiés au cours de ce chapitre, même si les études de cinétique ont été utilisées pour l'étude d'autres systèmes, comme le métabolisme des triglycérides, des acides gras, du glucose et de l'insuline.

3.1 Traceurs

L'étude de la cinétique des protéines est réalisée à l'aide de traceurs. On définit un traceur comme une molécule chimiquement et fonctionnellement identique à la molécule naturelle à l'étude (le « tracé »), mais suffisamment distincte de cette dernière afin que son évolution puisse être suivie dans le système biologique étudié. L'information recueillie sur le comportement du traceur permet d'obtenir de l'information sur le métabolisme du tracé, présumant que le traceur et le tracé soient métabolisés de façon identique.

Un traceur doit comporter certaines caractéristiques pour que l'information qu'il procure soit utile et valide : 1) il doit être détectable avec une sensibilité et une précision adéquate; 2) il ne doit pas perturber le système à l'étude; et 3) il ne doit pas être discriminé du tracé au plan métabolique (447, 448). L'avènement de traceurs isotopiques au cours des années 1930 a constitué une étape charnière dans l'évolution de l'étude du métabolisme. Comme les isotopes d'un même élément se distinguent uniquement par le nombre de neutrons contenu dans leur noyau, les propriétés chimiques des traceurs isotopiques sont pratiquement identiques à celles des molécules naturelles (449). L'impact du marquage isotopique au plan métabolique est donc limité. Malgré que les premières études métaboliques aient privilégié l'utilisation d'isotopes stables (450, 451), les radio-isotopes, plus particulièrement le ^{14}C et le ^3H , furent utilisés de façon prédominante lors des années 50 et 60 en raison de la disponibilité des compteurs à scintillations et de leur haute sensibilité qui permettait l'utilisation de faibles quantités de traceurs (449). Au cours des années 70, l'accroissement de la commercialisation des isotopes stables, l'avènement d'appareils jumelant la spectrométrie de masse par quadrupole à la chromatographie en phase gazeuse (*gas chromatograph-mass spectrometer*, GC-MS) facilitant la mesure d'enrichissement isotopique et la conscientisation face aux risques biologiques liés à l'exposition à la radioactivité favorisèrent le retour des isotopes stables (452). Seul des traceurs contenant des isotopes stables ont été utilisés lors des présents travaux.

3.2 Méthodes de marquage

Le marquage isotopique des protéines peut être réalisé de façon exogène ou de façon endogène.

3.2.1 Marquage exogène

Le marquage exogène consiste à synthétiser ou à isoler le composé d'intérêt et à le marquer in vitro afin d'obtenir un traceur. Pour l'étude de la cinétique des protéines, l'iode¹²⁵ a largement été utilisé pour la préparation de tels traceurs en raison de la facilité avec laquelle il peut être fixé de façon covalente aux acides aminés tyrosine (453). Un traceur ainsi obtenu peut ensuite être réinjecté dans l'organisme à l'étude et l'évolution de son activité spécifique (désintégrations/minute) en fonction du temps permet de dériver le taux de

catabolisme ou le taux de conversion du tracé. Cette méthodologie implique la présomption que le marquage isotopique et l'activité spécifique subséquentement mesurée sont directement proportionnels à la masse du traceur (454). Le principal désavantage du marquage exogène réside dans le fait que le traceur a été manipulé et modifié *ex vivo*, ce qui risque d'altérer son comportement métabolique (454, 455). De plus, les traceurs exogènes ne fournissent qu'une information indirecte sur les taux de synthèse ou d'excrétion des métabolites étudiés en raison du fait que leur apparition dans le système à l'étude est dictée par le taux auquel ils y sont artificiellement introduits. Étant donné la grande sensibilité des compteurs à scintillations, les traceurs radio-isotopiques avaient l'avantage de pouvoir être utilisés à des doses minimales, limitant les perturbations sur l'équilibre du système à l'étude (449). Toutefois, les risques liés à l'exposition au rayonnement radioactif demeurent la principale raison du déclin des traceurs exogènes dans l'étude du métabolisme chez l'humain.

3.2.2 Marquage endogène

Le marquage endogène repose sur l'injection de précurseurs métaboliques marqués (448). Le marquage des métabolites étudiés se produit donc *in vivo*, lorsque les précurseurs marqués sont utilisés lors de leur synthèse. Pour l'étude de la cinétique des protéines, les isotopomères d'acides aminés, des acides aminés contenant des isotopes, sont les traceurs les plus utilisés pour ce type de marquage. Une variété d'isotopomères d'acides aminés ont été utilisés pour étudier la cinétique des protéines comme la [$^{13}\text{C}_2$]lysine, la [$^2\text{H}_3$]valine, la [^{13}C]leucine, et la [$^2\text{H}_3$]leucine, et les études démontrèrent leur équivalence comme traceurs (456). Pour les études qui composent la présente thèse, la leucine triplement marquée au deutérium sur le carbone en position 5 a été utilisée comme traceur (5,5,5- $^2\text{H}_3$ -leucine). En raison de la présence de trois atomes de deutérium, cet isotopomère de la leucine a une masse atomique supérieure de 3 unités ($m+3$) comparativement à l'isotopomère de leucine le plus abondant dans la nature. Cette différence de masse peut être résolue par GC-MS, ce qui permet de suivre l'abondance de la $^2\text{H}_3$ -leucine dans le pool de leucine d'une protéine en fonction du temps. Contrairement au marquage exogène, l'utilisation de radio-isotopes ou d'isotopes stables n'est pas méthodologiquement favorisée lors du marquage endogène. Ce type de marquage a comme avantage de permettre l'observation de l'apparition du

traceur dans le pool du métabolite à l'étude, fournissant de l'information précieuse sur la synthèse et l'excrétion de ce dernier (447). Le marquage endogène a cependant le désavantage de complexifier l'analyse des données de cinétique, car celle-ci doit tenir compte de la cinétique du traceur dans le pool précurseur qui, elle, ne peut généralement pas être décrite directement (voir section 3.3.3.1)(448). Dans le cas des protéines avec un faible taux de renouvellement, le recyclage des acides aminés suite au catabolisme des protéines ayant incorporé le traceur peut aussi être une source d'erreur difficilement quantifiable (457). Enfin, le marquage endogène entraîne l'incorporation du traceur au niveau de tous les composés synthétisés à partir du précurseur utilisé ce qui permet d'analyser simultanément la cinétique de plusieurs protéines (458, 459). Chacune des protéines étudiées doit par contre être individuellement purifiée afin de dériver ses paramètres de cinétique spécifiques.

3.3 Méthode d'administration des traceurs

Les traceurs peuvent être administrés de deux façons, par impulsion (injection d'un bolus) et par infusion constante. Ces deux méthodes d'administration ont été utilisées lors des travaux inclus dans la présente thèse.

3.3.1 Impulsion

Cette méthode consiste à introduire le traceur dans le système à l'aide d'une seule dose ponctuelle. Pour le marquage endogène des protéines, l'introduction d'un acide aminé marqué dans le système à l'aide d'une seule dose provoque en premier lieu l'enrichissement isotopique du pool intracellulaire d'acides aminés. Le traceur (ex. $^2\text{H}_3$ -leucine) et le tracé (ex. leucine) sont ensuite incorporés aux protéines lors de leur synthèse dans un ratio proportionnel à l'enrichissement du pool précurseur. Le transfert du traceur du pool précurseur vers le pool de protéines entraîne une diminution du ratio traceur/tracé au niveau du pool précurseur et une augmentation du ratio traceur/tracé au niveau du pool protéique (448). L'épuisement progressif du traceur dans le pool précurseur provoque éventuellement le déclin du ratio traceur/tracé au niveau du pool protéique. L'analyse de l'apparition et de l'élimination du traceur au niveau du pool protéique d'intérêt en fonction du temps permet de dériver les paramètres de cinétique des protéines étudiées. Le marquage

endogène des protéines par impulsion isotopique peut être effectué autant à l'aide d'isotopomères stables que de radio-isotopomères. Toutefois, la sensibilité relativement faible des spectromètres de masse oblige l'injection de fortes doses de traceur lorsque des isotopes stables sont utilisés. Ceci ne semble toutefois pas influencer le métabolisme des protéines (460, 461).

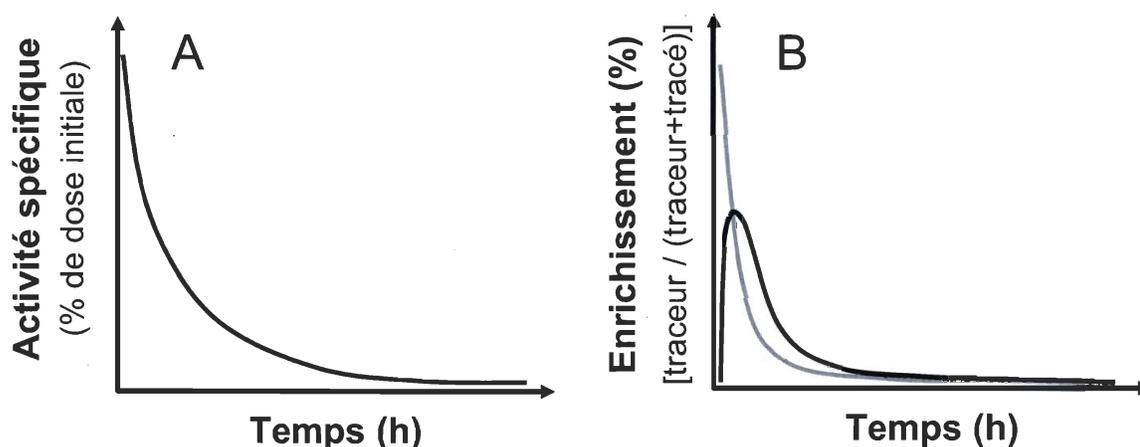


Figure 3.1 : *Panneau A* : marquage exogène; évolution de l'activité spécifique résiduelle (% de l'activité initiale) en fonction du temps d'un traceur exogène injecté par impulsion isotopique. *Panneau B*: marquage endogène; évolution de l'enrichissement isotopique mesuré par spectrométrie de masse au sein d'un pool de traceur/tracé en fonction du temps suite à une impulsion de traceur isotopique stable. La ligne (—) représente l'évolution de l'enrichissement au niveau du pool de traceur/tracé libre (pool précurseur). La ligne (---) représente l'évolution de l'enrichissement isotopique mesuré au sein d'une protéine incorporant le traceur lors de sa synthèse. L'intersection des deux courbes au pic d'enrichissement de la protéine confirme la présence de la relation précurseur-produit. L'enrichissement au niveau de la protéine croît tant que l'enrichissement au niveau du pool précurseur le permet. Lorsque le traceur s'épuise au niveau du pool précurseur, l'enrichissement au niveau du produit commence à décliner.

3.3.2 Infusion constante

Cette méthode d'administration consiste à introduire le traceur dans le système à un rythme constant pendant une période de temps déterminée. L'analyse subséquente des données de cinétique repose sur la présomption que l'abondance du traceur dans le pool précurseur est constante tout au long de l'infusion. Ainsi, tel qu'illustré dans la **Figure 3.2**, lors d'une infusion constante d'isotopomère d'acide aminé, le ratio traceur/tracé mesuré dans le pool d'une protéine donnée atteindra éventuellement le ratio traceur/tracé observé au niveau du

pool précurseur d'acides aminés (448). La vitesse à laquelle le ratio traceur/tracé d'un pool protéique tend à rejoindre le plateau d'enrichissement du précurseur dépend de la vitesse à laquelle ce pool protéique est renouvelé. Cette relation permet de dériver les paramètres de cinétique de cette protéine spécifique. Afin d'accélérer l'atteinte de l'équilibre du traceur au sein du pool précurseur, l'infusion constante peut être précédée d'une impulsion isotopique du même traceur (*primed-constant infusion*). Ceci permet d'obtenir des valeurs d'enrichissement plus élevées, donc plus précises, dans un délai raisonnable (12 à 15h), et facilite l'étude du métabolisme des protéines montrant un faible taux de renouvellement (448).

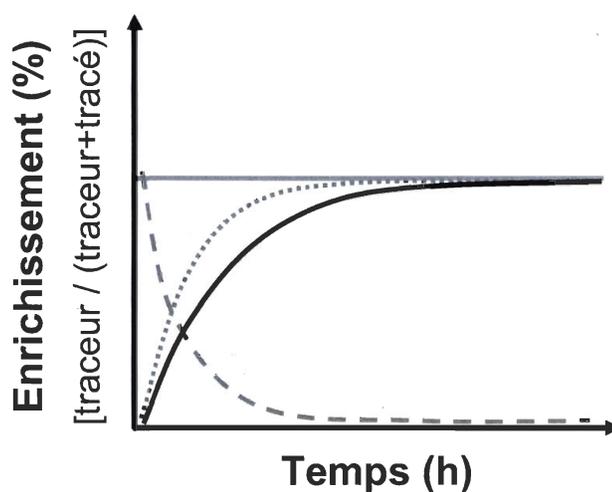


Figure 3.2 : Évolution de l'enrichissement isotopique mesuré au sein du pool de traceur/tracé libre (pool précurseur, —) et du pool d'un produit (—) en fonction du temps lors d'une infusion constante de traceur précédée d'une impulsion isotopique (*primed-constant infusion*). La ligne (---) représente l'évolution du traceur injecté lors de l'impulsion initiale alors que la ligne (···) représente l'infusion constante de ce même traceur. La ligne (—), qui correspond à l'enrichissement du pool précurseur (constant), représente la somme de la cinétique du traceur provenant de l'impulsion initiale et de l'infusion constante.

3.3.3 Marquage endogène : Infusion constante vs impulsion

3.3.3.1 Problème du pool précurseur

Un des problèmes majeurs dans l'étude de la cinétique des protéines par marquage endogène consiste en l'estimation de l'enrichissement isotopique du véritable pool

précurseur pour la synthèse protéique, soit le pool intracellulaire d'ARN de transfert (ARNt). Ce paramètre doit être connu afin que les paramètres de cinétique dérivés reflètent les véritables taux de sécrétion, de conversion et d'élimination. Toutefois, l'enrichissement du pool d'ARNt intracellulaire ne peut être mesuré qu'à l'aide de biopsies. Des études ont démontré que l'enrichissement isotopique des acides aminés plasmatiques libres ne constitue pas une approximation satisfaisante de l'enrichissement du pool précurseur d'ARNt (448, 462).

Lors d'une infusion constante, l'enrichissement du pool précurseur véritable peut être relativement bien estimé à l'aide de deux méthodes. D'abord, il peut être déterminé par le plateau d'enrichissement atteint au sein d'un pool protéique dont le taux de renouvellement est particulièrement rapide. Par exemple, pour l'étude du métabolisme des protéines plasmatiques produites au foie, le plateau d'enrichissement observé au niveau du pool d'apoB-100 des VLDL peut être utilisé comme un estimé précis de l'enrichissement du pool d'ARNt, assumant que le plateau d'enrichissement du pool d'apoB-100 des VLDL reflète l'enrichissement du pool hépatique de leucine (452, 462). L'autre méthode, moins utilisée, consiste à mesurer le plateau d'enrichissement du pool plasmatique d'alpha-kétoisocaproate, un métabolite « réciproque » généré lors de la première étape du métabolisme intracellulaire de la leucine. L'équivalence entre la mesure du plateau d'enrichissement de l'apoB-100 des VLDL et du pool plasmatique de α -kétoisocaproate a été démontrée (462, 463).

Lorsqu'une impulsion d'acides aminés marqués est utilisée, l'enrichissement du pool précurseur évolue constamment en fonction du temps et la cinétique du traceur au sein du pool précurseur doit être considérée dans les calculs des paramètres de cinétique. Toutefois, comme la cinétique du traceur dans le pool précurseur ne peut être mesurée directement, la cinétique du traceur libre en circulation est considérée comme une approximation satisfaisante de sa cinétique au sein du pool précurseur (452).

3.3.3.2 Information obtenue

L'infusion constante, contrairement à l'impulsion isotopique, peut difficilement être réalisée sur une période de temps supérieure à 12-15h et fournit donc une information

limitée, surtout lorsque la cinétique d'une protéine avec un faible taux de renouvellement est étudiée (457). L'impulsion isotopique possède l'avantage de pouvoir s'étendre sur plusieurs jours et fournit une information directe sur le taux de catabolisme et de conversion des protéines étudiées en permettant d'apprécier l'élimination progressive du traceur au niveau de leur pool (464). De plus, dans un système complexe comme le métabolisme de l'apoB-100, l'impulsion isotopique permet aussi d'apprécier visuellement la relation précurseur-produit unissant les différentes fractions lipoprotéiques (351, 465). Il est important de noter que les deux techniques d'administration peuvent être utilisées simultanément pour maximiser l'information obtenue. Lors de l'étude de la cinétique des protéines, il est possible d'administrer un bolus d'un acide aminé marqué (ex : ^{15}N -glycine), puis de procéder à l'infusion constante d'un acide aminé marqué différent (ex : $^2\text{H}_3$ -leucine) (448). La dynamique de chacun des traceurs résolue par spectrométrie de masse permet ainsi de profiter des avantages des deux modes d'administration.

3.4 Analyse des études de cinétique

L'analyse des données expérimentales de cinétique cherche à déterminer le taux auquel les processus biologiques se produisent *in vivo*. Deux types de processus peuvent être quantifiés : le transport, qui consiste en l'excrétion ou l'absorption des métabolites (excrétion des VLDL par le foie, internalisation des LDL via le récepteur des LDL), et la transformation, qui se définit par la conversion d'un métabolite en un autre (délipidation des VLDL qui génère des LDL). Les données expérimentales brutes recueillies lors d'études de cinétique utilisant des traceurs isotopiques stables, comme dans la présente thèse, sont des séries de valeurs d'abondance isotopique obtenues à intervalles réguliers suivant l'administration du traceur. Ces valeurs d'enrichissement, une fois mises en graphique en fonction du temps, produisent des courbes de cinétique. L'ajustement mathématique (*modeling*, en anglais) de ces courbes permet d'extraire l'information cinétique qu'elles contiennent et de dériver les taux de sécrétion, de transfert et de catabolisme des protéines étudiées. Parmi les différentes approches utilisées pour extraire cette information, l'approche par modélisation pluricompartimentale est actuellement la plus populaire et la plus pertinente (464, 466). Ce type de modélisation permet de décomposer schématiquement les systèmes biologiques et de les représenter sous forme de

« compartiments » reliés entre eux par des « constante de transfert » de métabolites (**Figure 3.3**).

Les principaux avantages des modèles pluricompartimentaux sont leur capacité de tenir compte de l'hétérogénéité et de la complexité des processus métaboliques et de la possibilité qu'ils offrent d'intégrer dans leur structure les connaissances provenant d'études antérieures (466). L'ajustement optimal (*best fit*, en anglais) des données expérimentales en fonction de la structure du modèle est obtenu par régression linéaire approximative basée sur la méthode de la moindre somme des carrés des écarts à l'aide de logiciels informatiques (467, 468). Les prochaines sections exposent quelques concepts reliés à l'analyse pluricompartimentale à l'aide d'un exemple simple basé sur le métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB-100.

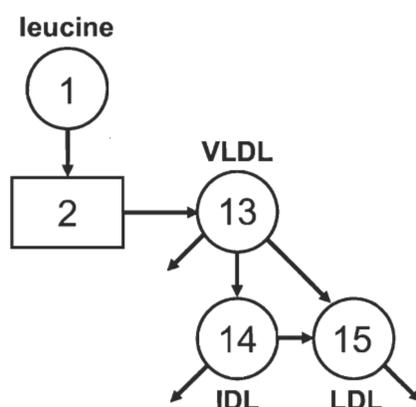


Figure 3.3: Modèle pluricompartimental simple représentant le métabolisme de l'apoB-100 au sein des VLDL (compartiment 13), des IDL (compartiment 14) et des LDL (compartiment 15) utilisé lors d'une étude de cinétique par infusion constante de $^2\text{H}_3$ -leucine (469). Voir les sections 3.4.1.1 et 3.4.1.2 pour une explication détaillée de l'anatomie du modèle

3.4.1 Modèles pluricompartimentaux

Prenons le modèle illustré dans la **figure 3.3** tiré d'une étude de cinétique par Tremblay et coll. du métabolisme des VLDL, IDL et LDL par infusion constante de $^2\text{H}_3$ -leucine (469).

3.4.1.1 Compartiments

Les compartiments sont représentés par des cercles (numéroté 1, 13, 14 et 15). Un compartiment est une sous-partie du système à l'étude et peut représenter un état moléculaire ou un espace physiologique. Ici les compartiments représentent des états moléculaires de la leucine. Le **compartiment 1** représente le pool précurseur de leucine, les **compartiments 13, 14 et 15** représentent respectivement la leucine présente au sein de l'apoB-100 dans les fractions VLDL, IDL et LDL. Le **compartiment 2** est un compartiment spécial qui permet de tenir compte du délai nécessaire pour la synthèse de l'apoB-100, la maturation et la sécrétion des VLDL. On assume que chaque compartiment contient une masse discrète et constante de leucine, constituée de la somme des masses de $^2\text{H}_3$ -leucine et de leucine naturelle. On connaît la grandeur de chacune de ces masses pour les **compartiments 13, 14 et 15**, car les concentrations d'apoB-100 associées aux VLDL, IDL et LDL sont mesurées expérimentalement à l'aide de dosage. Ces données servent à décrire l'état massique du système.

3.4.1.2 Constantes de transfert

Les constantes de transfert, représentés par les flèches, correspondent aux taux de transfert de matériel entre les différents compartiments du système. Une constantes de transfert est défini par l'expression $k(i, j)$, où k constitue la **fraction** de la masse du compartiment j transférée au compartiment i par unité de temps. Par exemple, la constante de transfert $k(14,13)$ représente la **fraction** d'apoB-100 ($^2\text{H}_3$ -leucine + leucine naturelle) en provenance des VLDL transférée aux IDL par unité de temps. Les constantes de transfert pointant vers l'extérieur, s'exprimant $k(0, j)$, représentent la fraction d'apoB-100 éliminée directement et irréversiblement du système. La somme des constantes de transfert quittant un compartiment constitue le taux de catabolisme fractionnel de ce compartiment (*fractional catabolic rate*, FCR), c'est-à-dire la fraction de la masse de ce compartiment qui est irréversiblement éliminée par unité de temps. Ce paramètre s'exprime en pools/unité de temps et est indépendant de la taille du pool étudié. La réciproque de ce paramètre (FCR^{-1}) correspond au temps de résidence moyen du traceur (et du tracé) dans ce compartiment et s'exprime en unité de temps/pool. Un temps de résidence court (ou un FCR élevé) reflète un taux de renouvellement rapide. Finalement, à l'état d'équilibre massique (*steady state*),

il est assumé que la perte d'une quantité de matériel d'un compartiment est systématiquement contrebalancée par le transfert d'une quantité égale de matériel vers ce compartiment, i.e. le FCR est contrebalancé par le taux de synthèse fractionnel (*fractional synthesis rate*, FSR). Assumant que le FSR est égal au FCR, un taux de production (PR) absolu (masse produite/unité de temps) ou ajusté (masse produite/unité de temps/unité de masse corporelle) au sein d'un compartiment donné peut être calculé en fonction du FCR :

$$PR \text{ absolu} = FCR \text{ (pools/jour)} \cdot \text{masse du pool (mg/pool)}$$

$$PR \text{ relatif} = FCR \text{ (pools/jour)} \cdot \text{masse du pool (mg/pool)} / \text{masse corporelle (kg)}$$

Les taux de transfert et d'élimination nécessaire au calcul des différents paramètres de cinétique (FCR et PR) est cependant inconnue. La section suivante explique brièvement comment est déterminée la valeur de chacune des constantes de transfert en modélisation pluricompartimentale.

3.4.1.3 Équations différentielles

Dans le logiciel de modélisation SAAM II qui fut utilisé lors des présents travaux, la construction schématique d'un modèle définit simultanément un système d'équations différentielles (467). La résolution de ce système d'équations consiste à déterminer les valeurs des différents flux qui permettront l'ajustement optimal (*best fit*) des données expérimentales de cinétique en fonction de la structure du modèle. Par exemple, les équations différentielles permettant de définir le transfert de traceur et de masse totale (traceur + tracé) à l'intérieur du **compartiment 15** (représentant l'apoB-100 des LDL) se lisent comme suit :

$$dq_{15}/dt = k(15,13) \cdot q_{13} + k(15,14) \cdot q_{14} - k(0,15) \cdot q_{15} \quad (\text{eq.1})$$

$$dQ_{15}/dt = k(15,13) \cdot Q_{13} + k(15,14) \cdot Q_{14} - k(0,15) \cdot Q_{15} \quad (\text{eq.2})$$

où chaque q_x et Q_x représentent respectivement la masse de traceur et la masse totale (traceur + tracé) comprises dans chaque compartiment x (449). Ainsi, l'évolution de la masse du **traceur** (dq_{15}) dans les LDL dans un intervalle de temps donné (dt) se définit par la somme des quantités de **traceur** transférées à ce compartiment en provenance des VLDL

$[k(15,13) \cdot q_{13}]$ et des IDL $[k(15,14) \cdot q_{14}]$ et de la quantité de **traceur** éliminée irréversiblement des LDL par leur catabolisme $[-k(0,15) \cdot q_{15}]$.

Étant donné qu'il est assumé que le système est à l'état d'équilibre massique (*steady state*), la **masse totale** de traceur et de tracé « Q » comprise dans chaque compartiment est constante. En d'autres mots, la dérivée de dQ/dt est systématiquement nulle, peu importe le compartiment.

La masse de **traceur** « q » comprise dans chaque compartiment, quant à elle, varie en fonction du temps et permet de quantifier les différents taux de transport et de transfert. Le mouvement d'un traceur dans un système physiologique repose sur l'absence de discrimination entre le traceur et le tracé. Ainsi, la probabilité qu'a une molécule de traceur d'être métabolisée (par exemple : la probabilité qu'un acide aminé marqué soit incorporé à une chaîne peptidique lors de sa synthèse, qu'une VLDL soit métabolisée en IDL) dépend uniquement de sa masse relative dans le pool de métabolite précurseur*. Ce jeu de probabilités fait en sorte que l'évolution de la masse de traceur dans chaque compartiment en fonction du temps n'est jamais linéaire et suit généralement une équation exponentielle de premier ordre (448). L'équation exponentielle associée à chacun des compartiments du modèle est définie par l'intégration de l'équation différentielle représentant le mouvement du traceur au sein de ce compartiment (eq.1 dans le présent exemple). Chaque compartiment d'un modèle pluricompartimental est donc associé à une équation exponentielle (466). Cette relation un 1 compartiment - une exponentielle fut mise à profit dans les travaux sur l'hétérogénéité des LDL au chapitre 6. Lors de cette étude, la cinétique de la leucine dans les différentes fractions lipoprotéiques était trop complexe pour être ajustée de façon satisfaisante à une seule exponentielle (un seul compartiment), l'utilisation de compartiments supplémentaires permettait d'exprimer la cinétique du traceur sous la forme d'une somme d'équations exponentielles (voir **Figure 6.2** p. 128).

Ces méthodes de traçage et de modélisation pluricompartimentale ont précédemment été utilisées pour étudier le métabolisme intravasculaire de l'apoC-III, de la CRP et de l'apoB-

* Ici, le terme précurseur peut aussi s'appliquer à un « produit », comme dans le fait que les VLDL constituent le principal « précurseur » des IDL.

100 chez l'humain. Les prochaines sections résument l'information pertinente que ces techniques ont permis d'obtenir jusqu'à maintenant sur chacune de ces protéines.

3.5 Cinétique de l'apoC-III

3.5.1 Études d'observation

Les toutes premières études du métabolisme intravasculaire de l'apoC-III à l'aide de traceur chez l'humain ont été réalisées à la fin des années 1970 par Berman et coll (276). Ceux-ci marquèrent le contenu protéique de VLDL, composé principalement des apolipoprotéines B-100, E et C, à l'aide d'iode¹²⁵ afin de comparer leur métabolisme sur une période de 10 à 14 jours chez 4 individus normolipidémiques et 10 individus hyperlipidémiques. Leur modèle mathématique élaboré permettait de tenir compte du transfert bidirectionnel d'apoC entre les VLDL et HDL circulantes et d'analyser simultanément la cinétique des apolipoprotéines B-100 et C (C-I, C-II et C-III confondues). Ils rapportèrent un meilleur ajustement des données expérimentales en contraignant l'élimination des apoC au niveau des HDL. Ils notèrent aussi que le taux de catabolisme des apoC, contrairement à celui de l'apoB, était sensiblement le même chez les sujets normolipidémiques et hyperlipidémiques, suggérant une absence de relation entre le catabolisme de l'apoB et des apoC. Cependant, comme cette étude portait sur la cinétique simultanée de toutes les espèces d'apoC, celle-ci ne fournit donc qu'une information partielle sur la cinétique intravasculaire de l'apoC-III et sur son rôle dans les divers types d'hyperlipidémie.

Depuis, un peu plus d'une dizaine d'études ont été réalisées sur la cinétique spécifique de l'apoC-III. À cette fin, l'infusion constante de ²H₃-leucine précédée d'un bolus (470, 471), la simple injection d'un bolus de ²H₃-leucine (472, 473), l'injection de VLDL marquées à l'iode¹²⁵ (277, 474) et l'injection de HDL reconstituées dont seul le contenu en apoC-III était spécifiquement marqué à l'iode¹²⁵ (475) ont tous été utilisées afin d'examiner le métabolisme de l'apoC-III dans différents contextes métaboliques. Selon l'ensemble de ces études, le temps de résidence moyen de l'apoC-III en circulation chez les individus normolipidémiques varierait entre 12 heures (FCR de 2 pools/jour) et 48 heures (FCR de 0.5 pool/jour). L'apoC-III se trouvant à la fois sur les HDL (apoC-III_{HDL}) et les VLDL (apoC-III_{VLDL}), certains ont étudié son métabolisme spécifiquement dans chacune de ces

fractions (280, 473). En ce sens, Batal et coll. montrèrent que le pool d'apoC-III_{HDL} semblait se renouveler à un taux inférieur comparativement au pool d'apoC-III_{VLDL} (476). Cette observation fut utilisée pour appuyer l'idée qu'une fraction de l'apoC-III ne serait pas transférable entre les VLDL et les HDL, interprétation qui fut partiellement réfutée par le développement de nouvelles techniques de purification tel que mentionné dans la section 2.1.1 (281).

Les études menées chez des individus hypertriglycéridémiques à l'aide de traceurs exogènes semblaient associer une augmentation des concentrations plasmatiques d'apoC-III à une diminution de son taux de catabolisme (277, 474). Huff et coll. expliquaient cette observation par un retard concomitant du catabolisme des VLDL, processus qui pourrait constituer une des voies d'élimination de l'apoC-III. Toutefois, une série d'études plus récentes menées par Cohn et coll. utilisant l'infusion constante de ²H₃-leucine suggèrent plutôt que la production accrue d'apoC-III, plus spécifiquement d'apoC-III_{VLDL}, serait le principal déterminant de l'augmentation des concentrations plasmatiques d'apoC-III et de triglycérides observée dans la plupart des types d'hyperlipidémie (280, 470). Récemment, Chan et coll. ont étudié la cinétique de l'apoC-III_{VLDL} et de l'apoC-III_{HDL} sur 96 heures chez 39 individus obèses et 12 individus non obèses par l'injection d'un bolus de ²H₃-leucine (473). Les obèses, qui montraient des concentrations supérieures d'apoC-III_{VLDL} (79.6 ± 3.8 mg/l vs 41.6 ± 6.6 mg/l), étaient caractérisés par un taux de catabolisme légèrement, mais significativement réduit de l'apoC-III_{VLDL} et de l'apoC-III_{HDL}. Une différence beaucoup plus marquée était toutefois observée au niveau du taux de production d'apoC-III_{VLDL}, qui était 36 % plus élevé chez les obèses comparativement au groupe témoin (2.12 ± 0.14 mg/kg·j vs 1.56 ± 0.29 mg/kg·j). De plus, les concentrations et le taux de production d'apoC-III_{VLDL} étaient tous deux fortement corrélés positivement aux concentrations de VLDL et de triglycérides circulantes chez les obèses, alors que seule une association entre le taux de production de l'apoC-III_{VLDL} et les concentrations plasmatiques de triglycérides était observée chez les individus non obèses.

Les conclusions provenant de ces études d'observation suggèrent que l'augmentation des concentrations plasmatiques d'apoC-III, principalement d'apoC-III_{VLDL}, en présence d'hypertriglycéridémie et d'obésité pourrait s'expliquer, en majeure partie, par une

augmentation du taux de production de l'apoC-III et, dans une moindre partie, par une diminution du taux de catabolisme de l'apoC-III.

3.5.2 Études d'intervention

Le métabolisme de l'apoC-III a aussi été étudié en contexte d'intervention pharmacologique chez des individus hypertriglycéridémiques ou caractérisés par le syndrome métabolique. Ces études portaient principalement sur l'impact des statines, et du fenofibrate. Malmendier et coll. ont montré que la combinaison d'une perte de poids de 3 à 6.5% et d'un traitement au fenofibrate chez 4 individus hypertriglycéridémiques permettait une réduction des concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoC-III de l'ordre de 50%. Ces diminutions étaient associées à une augmentation de 60% du taux de catabolisme de l'apoC-III, mesuré par l'injection d'apoC-III marquées de façon exogène à l'aide de radio-isotopes (475). Chan et coll., par marquage endogène à l'aide d'isotopes stables, ont montré qu'un traitement à l'atorvastatine (40 mg/j) ou au fenofibrate (200 mg/j) chez 11 hommes atteints du syndrome métabolique étaient tous deux associés à une réduction des concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoC-III_{VLDL} de 30 et 40% respectivement (477). Ces changements s'expliquaient majoritairement par une augmentation de 30% du taux de catabolisme et une diminution de l'ordre de 20% du taux de production de l'apoC-III_{VLDL}. La production d'apoC-III plasmatique totale ne semblait pas affectée par aucun des deux traitements. De façon similaire, Oi et coll. ont aussi montré chez 12 hommes caractérisés par le syndrome métabolique que le traitement à la rosuvastatine induisait une diminution des concentrations plasmatiques de triglycérides et de apoC-III_{VLDL}, effet qui était parallèle à une augmentation du taux de catabolisme et une diminution du taux de production de l'apoC-III_{VLDL} proportionnelle à la dose de statine utilisée (478).

Deux études ont investigué le métabolisme de l'apoC-III en contexte d'intervention nutritionnelle. La première, par Huff et coll., a montré chez 6 individus normolipidémiques qu'une diète isocalorique riche en glucides induisait une augmentation moyenne de 50 % des concentrations plasmatiques de triglycérides et menait à une augmentation moyenne du taux de production de l'apoC-III de plus de 70% (474). Desroches et coll., en comparant l'impact d'une diète riche en glucides à une diète riche en acides gras mono-insaturés,

toutes deux consommées *ad libitum*, observèrent que les changements de taux de production d'apoC-III expliquaient 30% des changements de concentrations plasmatiques de triglycérides en réponse à la diète dans un modèle qui incluait, entre autres, l'âge, les concentrations plasmatiques de TG de base, la variation du poids corporel, l'activité des lipases lipoprotéique et hépatique et l'apport énergétique (471).

Les observations provenant de ces études d'intervention semblent, à première vue, divergentes quant à la modulation préférentielle du taux de catabolisme ou du taux de production de l'apoC-III en lien avec la modulation des concentrations plasmatiques d'apoC-III et de triglycérides. Il est intéressant de noter qu'une forte diminution des concentrations plasmatiques de triglycérides semble se traduire par un catabolisme accentué de l'apoC-III (477, 479), alors que lorsqu'une augmentation de la triglycéridémie est observée, celle-ci est plutôt parallèle à une augmentation de la production d'apoC-III (474).

L'ensemble des résultats des études d'observation et d'intervention supporte la présence d'un lien étroit entre la triglycéridémie et la cinétique intravasculaire de l'apoC-III. Il est toutefois important de souligner que le lien de causalité entre l'augmentation du taux de production d'apoC-III et l'augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides reste à être démontrée. À ce sujet, Lewis et coll. ont récemment démontré à l'aide d'infusion simultanée de $^2\text{H}_3$ -leucine, d'une émulsion lipidique et d'héparine que la présence accrue d'acides gras libres entraînerait une surproduction d'apoB-100, de triglycérides et d'apoC-III (152). Ces observations démontrent qu'une hypertriglycéridémie provoquée pourrait causer la sécrétion accrue d'apoC-III et suggèrent que les concentrations plasmatiques de triglycérides pourraient être un déterminant important du taux de production de l'apoC-III. À la lumière de ces observations, il semble que la relation entre les concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoC-III nous rapporte à l'analogie de l'œuf et de la poule. Serait-il possible en fait que la simple augmentation du nombre de lipoprotéines en circulation, particulièrement de VLDL et de résidus de VLDL, soit suffisant afin de faire augmenter les concentrations plasmatiques d'apoC-III. En d'autres mots, l'augmentation des concentrations d'apoC-III serait-elle simplement expliquée par l'augmentation du nombre de transporteurs. Indiscutablement, des études supplémentaires seront requises afin de mieux comprendre le rôle physiologique de l'apoC-

III et l'étroite relation unissant les concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoC-III.

Il est toutefois intéressant de noter que, parmi toutes les études de cinétique de l'apoC-III menées à ce jour, seules les études de Huff et coll. menées au début des années 1980 à l'aide de marquage radio-isotopique exogène ont considéré plus d'un isoforme de l'apoC-III, soit les isoformes mono- et bi-sialylée (277, 474). Ces études suggèrent une certaine ressemblance des deux isoformes en termes de métabolisme intravasculaire autant chez les individus normolipidémiques que les individus hypertriglycéridémiques. Toutefois, l'association entre le métabolisme intravasculaire de chacune des isoformes de l'apoC-III et les anomalies lipidiques associées à la dyslipidémie athérogène du syndrome métabolique n'a pas encore été formellement examinée et mériterait certainement d'être approfondie.

3.6 Cinétique de différentes sous-classes de LDL

Le métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB-100 (VLDL, IDL et LDL), est sans doute le système physiologique auquel a été consacré le plus grand nombre d'études de cinétique. Chaque lipoprotéine sécrétée par le foie ne contient qu'une seule molécule d'apoB-100 et celle-ci demeure liée à la même particule lipoprotéique tout au long de son séjour intravasculaire. Ainsi, le marquage de l'apoB-100 représente une façon idéale d'étudier les taux de production, de catabolisme et de conversion des lipoprotéines responsables du transport des lipides d'origine endogène (464).

Le métabolisme de l'apoB-100 a été largement étudié dans divers contextes physiologiques, dont celui du syndrome métabolique. Les prochaines sections, dans un souci de concision, se limitent à citer les études d'observation ayant permis de mieux caractériser les anomalies du métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB-100 dans le contexte du syndrome métabolique. L'impact d'interventions nutritionnelles et pharmacologiques sur le métabolisme de l'apoB-100 sera brièvement résumé. Enfin, les études de cinétique s'étant attardées au concept de l'hétérogénéité des LDL seront revues plus en détail.

3.6.1 Cinétique de l'apoB-100 : généralités

Les premières études de la cinétique des lipoprotéines *in vivo* chez l'humain étudièrent le transfert de radioactivité entre les fractions lipoprotéiques de différente densité suite à l'injection de VLDL marquées à l'iode¹²⁵ et démontrèrent, entre autres, la relation précurseur-produit unissant les VLDL et les LDL (480). Les études plus récentes, qui privilégiaient le marquage endogène à l'aide d'isotopomères stables d'acides aminés (481), confirmèrent les observations obtenues par l'utilisation de traceurs exogènes. Les études plus récentes, entre autres, mirent en évidence l'hétérogénéité des différentes fractions lipoprotéiques en termes de métabolisme intravasculaire (482). Certaines des études les plus élaborées proposèrent différents modèles mathématiques pour tenir compte de cette hétérogénéité lors de l'analyse pluricompartimentale des données expérimentales de cinétique (**Figure 3.4**) (483, 484).

Malgré le degré de complexité varié des modèles utilisés, les paramètres de cinétique dérivés pour les VLDL, IDL et LDL sont relativement constants d'une étude à l'autre (485). Ainsi, les études de cinétique conduites jusqu'à maintenant révélèrent que, chez les individus normolipidémiques, le taux de catabolisme des VLDL, IDL et LDL serait respectivement d'environ 10, 13 et 0.5 pools/jour (485). En d'autres mots, le temps de résidence moyen en circulation est d'environ 2 à 3 heures pour les VLDL et les IDL, alors que chaque particule LDL peut demeurer de 2 à 3 jours dans l'espace vasculaire. Certaines caractéristiques des modèles proposés actuellement semblent encore controversées. Parmi celles-ci, la sécrétion hépatique d'apoB-100 sous forme de LDL pour expliquer l'apparition précoce de LDL marquées lors d'étude de marquage endogène est encore vivement débattue (486). Bien que des études *in vitro* appuient l'hypothèse de la sécrétion hépatique directe de lipoprotéines de densité comparable à celle des LDL (452), l'apparition rapide de LDL *in vivo* pourrait également s'expliquer par l'hydrolyse rapide de VLDL. Ce débat revêt un intérêt particulier sachant que certains types d'intervention, comme la perte de poids, pourraient moduler l'apparition rapide des LDL en circulation (483). Toutefois, la résolution des études de cinétique actuelles ne permet pas de déterminer si cette production rapide de LDL provient d'une sécrétion directe de LDL ou de l'hydrolyse de précurseurs lipoprotéiques.

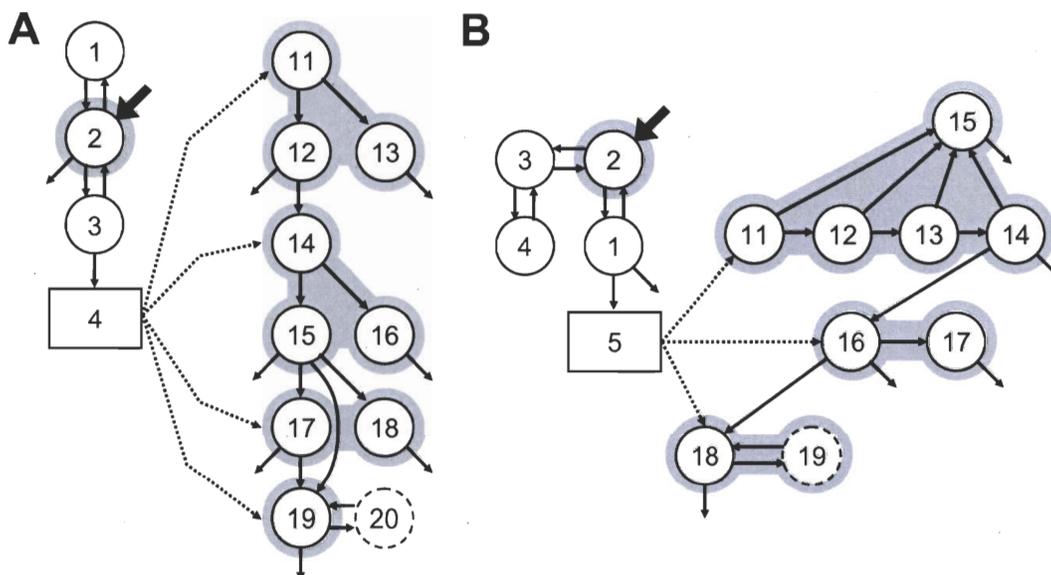


Figure 3.4 : Exemples de modèles pluricompartimentaux complexes utilisés pour l'étude de la cinétique de l'apoB-100. *Panneau A* : modèle développé par Demant et coll. Les compartiments 1, 2 et 3 décrivent la cinétique du traceur libre (pool précurseur). Les compartiments 11, 12 et 13 décrivent la cinétique des VLDL₁, les compartiments 14, 15 et 16 la cinétique des VLDL₂, les compartiments 17 et 18 la cinétique des IDL et le compartiment 19 décrit la cinétique intravasculaire des LDL (461). *Panneau B* : modèle développé par Ginsberg et coll. Les compartiments 1, 2, 3 et 4 décrivent la cinétique du traceur libre (pool précurseur). Les compartiments 11, 12, 13, 14 et 15 servent à la description de la cinétique des VLDL, le compartiment 15 représentant un pool de VLDL avec un faible taux de renouvellement. Les compartiments 16 et 17 décrivent la cinétique des IDL alors que le pool 18 décrit la cinétique intravasculaire des LDL (483). Ces deux modèles ont en commun de présumer la sécrétion directe d'apoB-100 dans chacune des fractions lipoprotéiques (••••). Ces deux modèles incluent également des compartiments (compartiments 20 et 19, panneau A et B respectivement) qui permettraient de tenir compte de la capacité qu'ont les LDL de diffuser à travers l'endothélium vasculaire.

3.6.2 Études d'observation dans le contexte de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète de type 2

Le syndrome métabolique est caractérisé par une augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides et d'apoB-100 (197, 487). Les études de cinétique de l'apoB-100 réalisées à l'aide de radio-isotopes permirent d'expliquer cette anomalie par la sécrétion accrue de VLDL chez les individus hypertriglycéridémiques (483, 488) et chez les obèses (489). Chait et coll. notèrent cependant une production normale d'apoB-100 chez un petit groupe d'obèses normolipidémiques, suggérant que la sécrétion accrue de VLDL serait plus étroitement liée à l'hypertriglycéridémie qu'au surpoids (490).

Les études plus récentes réalisées à l'aide d'isotopes stables confirmèrent les observations obtenues à l'aide de traceurs radio-isotopiques (193, 491). Dans ce qui doit être l'étude la plus complète du métabolisme de l'apoB-100 dans le contexte de l'obésité, Chan et coll. ont procédé à une étude intégrée du métabolisme de l'apoB-100 des VLDL, IDL et LDL chez 48 obèses et 10 individus non-obèses, normolipidémiques et appariés pour l'âge et le sexe (194). Ceux-ci observèrent une production accrue de VLDL (+52% obèses vs témoins) et notèrent une diminution du taux de catabolisme des IDL et des LDL (-30 % et -37 % obèses vs témoins, respectivement) combinée à une réduction importante du taux de conversion des VLDL en IDL et LDL (-44% et -34% obèses vs témoins, respectivement). Cummings et coll. observèrent aussi une surproduction de VLDL chez six diabétiques de type 2 comparativement à six individus témoins appariés pour le sexe, l'âge et l'indice de masse corporelle (492). Hogue et coll., en plus d'observer une sécrétion accrue de VLDL, notèrent aussi une production augmentée de chylomicrons chez un groupe de diabétiques de type 2 (493). Utilisant une méthodologie raffinée, Gill et coll. montrèrent que la production de VLDL₁ riches en triglycérides était étroitement liée à l'indice de résistance à l'insuline HOMA chez 8 hommes et 8 femmes normolipidémiques résistants à l'insuline (494). Adiels et coll. corroborèrent ces observations en démontrant la surproduction de VLDL₁ dans le contexte du diabète de type 2 (178). Plusieurs de ces études observèrent de façon parallèle une conversion moins efficace des VLDL en IDL et LDL dans le contexte de l'obésité et du diabète de type 2 (193, 194, 493, 495).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation de la production hépatique d'apoB-100 sous forme de VLDL, et plus particulièrement sous forme de VLDL₁ riches en triglycérides, en contexte de résistance à l'insuline sont incertains. Toutefois, la disponibilité accrue d'acides gras libres au foie (177), de même qu'une diminution de l'inhibition de la synthèse d'apoB-100 par l'insuline seraient susceptibles de soutenir une sécrétion accrue de VLDL (181). La conversion diminuée des VLDL en IDL et LDL pourrait quant à elle provenir d'une atténuation de l'activité de la LPL résultant d'une réduction de la translocation de l'enzyme (191, 192) ou d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'apoC-III (194). La somme de ces processus physiologiques mènerait à l'accumulation de VLDL en circulation et à l'augmentation concomitante de la

triglycéridémie, caractéristique centrale de la dyslipidémie athérogène du syndrome métabolique.

3.6.3 Études d'intervention : perte de poids, nutrition et agents pharmacologiques

La perte de poids chez des individus obèses a été associée de façon constante à une diminution des concentrations plasmatiques de VLDL, changements qui étaient préférentiellement associés à une diminution du taux de production des VLDL (483, 496). Riches et coll. notèrent que la diminution de 50% du taux de production des VLDL et l'augmentation de 125% du taux de catabolisme des LDL qu'ils observèrent suite à une perte de poids de l'ordre de 10 kg chez 26 individus obèses était étroitement associée à la perte de masse adipeuse viscérale mesurée par MRI et à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline mesurée par HOMA (496).

Peu d'études de cinétique ont été menées dans un contexte d'intervention nutritionnelle chez des individus caractérisés par le syndrome métabolique. Une étude examinant l'effet d'une supplémentation en huile de poisson chez un groupe d'individus atteints du syndrome métabolique montra que la consommation d'acides gras oméga-3 diminuait la synthèse hépatique de VLDL et augmentait le taux de conversion des VLDL en LDL sans apporter de changement au niveau du catabolisme des VLDL ni des concentrations plasmatiques de LDL (497). Ces effets étaient hypothétiquement expliqués par la diminution de la synthèse hépatique de triglycérides précédemment observée en relation à la consommation d'acides gras omega-3 (498).

Les études visant à définir l'impact des statines et des fibrates sur le métabolisme de l'apoB-100 ont démontré de façon relativement constante que ces deux agents entraînaient une diminution des concentrations plasmatiques d'apoB-100, changements qui étaient corrélés à une augmentation du taux de catabolisme des toutes les fractions lipoprotéiques contenant l'apoB-100 (495, 499-502). Les statines montraient toutefois des bénéfices accrus quant à l'amélioration du taux de catabolisme des LDL comparativement aux fibrates (500, 502, 503). L'effet des statines et des fibrates sur la sécrétion hépatique de VLDL semble toutefois nébuleux. Certaines études ont montré une diminution de la

sécrétion de VLDL (504), d'autres aucun effet (502, 503). Cette divergence pourrait provenir de l'impact relativement restreint de ces traitements sur la sensibilité à l'insuline. En absence d'amélioration de la sensibilité à l'insuline, la synthèse hépatique de triglycérides et la production de VLDL pourraient être continuellement stimulées en raison de la persistance de concentrations plasmatiques élevées d'acides gras libres (502).

Enfin, les agonistes de PPAR- γ améliorent la sensibilité à l'insuline en stimulant la différenciation adipocytaire et le remodelage du tissu adipeux et favorisent le catabolisme des VLDL et des triglycérides plasmatiques. Les agonistes de PPAR- γ n'affecteraient pas la sécrétion hépatique de VLDL ni le métabolisme des IDL et des LDL chez les individus diabétiques de type 2 (505). L'élimination accrue des VLDL serait probablement due à l'augmentation des concentrations de LPL et à la diminution des concentrations plasmatiques d'apoC-III observées suite au traitement.

Ces études d'intervention soulignent particulièrement le fait que les désordres lipidiques associés au syndrome métabolique peuvent difficilement être modulés dans leur entièreté par l'utilisation d'agents pharmacologiques. La perte de poids, en revanche, semble bénéfique autant en ce qui a trait au métabolisme des triglycérides qu'à celui des LDL, appuyant le fait que ce type d'intervention devrait être la stratégie à adopter préférentiellement dans le traitement et la prévention des désordres métaboliques associés au syndrome métabolique.

3.6.4 Cinétique de l'apoB-100 et hétérogénéité des LDL

La grande majorité des études citées précédemment se limitèrent à décrire le métabolisme des grandes classes de lipoprotéines (VLDL, IDL et LDL). Pourtant, il est généralement admis que ces classes de lipoprotéines sont des ensembles hétérogènes en termes de contenu lipidique et protéique et de comportement métabolique (327). Quelques-unes des études citées précédemment ont procédé au fractionnement des VLDL pour étudier individuellement le métabolisme des VLDL₁ et des VLDL₂ et ont démontré le rôle critique des VLDL₁ dans l'expression de l'hypertriglycémie et de la dyslipidémie athérogène (178, 494, 506). L'hétérogénéité des LDL en termes de taille et de densité est elle aussi bien documentée (327, 362, 507). Bien que les LDL constituent la classe lipoprotéique

véhiculant la majorité du cholestérol en circulation et que celles-ci soient étroitement associées au développement de la MCV, les études de cinétique qui ont procédé au fractionnement des LDL dans le but d'étudier individuellement le métabolisme des sous-fractions de LDL sont peu nombreuses. De plus, la présence en circulation de LDL petites et denses, un déterminant important du profil de risque de MCV associé au syndrome métabolique, n'est que très peu documentée en termes de cinétique.

Théoriquement, l'étude de l'hétérogénéité des LDL en lien avec leur cinétique intravasculaire peut être réalisée de deux façons (482). D'abord, la cinétique globale des LDL peut être examinée chez des individus présentant différents profils de sous-classes de LDL. L'autre façon, méthodologiquement plus complexe, consiste à isoler différentes sous-fractions de LDL et à étudier simultanément leur cinétique. Chacune de ces avenues a été empruntée lors d'études antérieures et les prochaines sections résument les résultats et conclusions qu'elles ont permis d'obtenir.

3.6.4.1 Cinétique des LDL chez des individus montrant différents profils de population de LDL

Les deux seules études qui ont utilisé cette approche ont généré des conclusions divergentes. Yamane et coll. étudièrent l'impact de la taille des LDL sur leur métabolisme intravasculaire ainsi que sur leur affinité pour le récepteur LDL chez 17 hommes et 7 femmes présentant une légère hypercholestérolémie (508). L'injection de LDL autologues marquées à l'iode¹²⁵ suivie de prélèvements sanguins sur 14 jours leur servit à déterminer les paramètres de cinétique des LDL chez ces individus. Bien qu'ils observèrent l'association inverse bien documentée entre la taille des LDL et les concentrations plasmatiques de triglycérides ($r=-0.65$, $P=0.001$), ceux-ci ne furent pas en mesure d'établir de relation entre le diamètre et le taux de catabolisme des LDL ($r=-0.21$, $P=0.35$), ni ne purent montrer que la taille des LDL puisse influencer leur affinité pour le récepteur des LDL ($r=0.17$, $P=0.82$). Ils conclurent donc que la taille des particules LDL ne serait pas un facteur clé dans la liaison des LDL à leur récepteur ni dans la détermination de leur métabolisme intravasculaire.

Packard et coll., quant à eux, étudièrent la cinétique des LDL par marquage endogène à l'aide d'un isotopomère stable de la leucine chez 9 individus présentant une prédominance de LDL avec un diamètre supérieur à 26.0 nm en circulation (phénotype A), 5 individus présentant des LDL de diamètre variant entre 26.0 et 25.0 nm (phénotype I) et 6 individus hypertriglycéridémiques présentant des LDL de diamètres inférieurs à 25.0 nm (phénotype B) (350). Ceux-ci montrèrent une nette différence dans le taux de catabolisme des LDL entre les individus caractérisés par le phénotype A (0.55 ± 0.20 pool/jour) et ceux caractérisés par le phénotype B (0.36 ± 0.14 pool/j) ($P=0.045$ pour la comparaison). Le taux de production des LDL était le même chez tous les groupes de participants. Ceux-ci démontrèrent également une étroite association inverse entre les concentrations plasmatiques de triglycérides et le taux de catabolisme des LDL dans l'ensemble du groupe. Ceux-ci conclurent donc que la taille des LDL serait un déterminant important de leur métabolisme intravasculaire et que les LDL de diamètre réduit auraient un temps de résidence prolongé en circulation et pourraient ainsi contribuer à l'augmentation du risque cardiovasculaire, particulièrement chez les individus hypertriglycéridémiques.

La présence de participants hypercholestérolémiques dans l'étude de Yamane comparativement à la présence de sujets normolipidémiques et hypertriglycéridémiques dans l'étude de Packard constitue sûrement un facteur important pouvant expliquer la divergence des conclusions obtenues lors de ces deux études.

3.6.4.2 Cinétique de différentes sous-fractions de LDL

Les quelques études qui ont privilégié cette approche ont pour la plupart généré des conclusions similaires. Fisher et coll. utilisèrent l'injection d'un bolus de ^3H -leucine afin d'observer la cinétique de trois différentes classes de LDL, séparées par ultracentrifugation séquentielle, chez 4 individus hypertriglycéridémiques (509). Leurs observations démontrèrent que les LDL de plus hautes densités avaient un temps de résidence en circulation 80 % supérieur à celui des LDL de plus faibles densités. Leurs résultats suggérèrent également que la majorité (90%) de l'apoB-100 des LDL quittait définitivement la circulation via le pool de LDL de densité élevée et que les LDL de faibles densités devaient d'abord être converties en LDL denses afin d'être éliminées de façon définitive. Les courbes d'enrichissements présentées suggéraient aussi la présence d'une

relation précurseur-produit entre les différentes classes de LDL chez la plupart des participants.

Dans un groupe d'individus davantage diversifiés comprenant 7 sujets montrant une hyperapobetalipoprotéïnémie, 5 hétérozygotes avec hypercholestérolémie familiale (HF), et 6 sujets témoins, Teng et coll. utilisèrent le marquage exogène différentiel de LDL autologues de faibles densités (iode¹²⁵) et de hautes densités (iode¹³¹) pour étudier directement les interrelations métaboliques entre ces deux fractions lipoprotéiques (351). Leurs résultats, en accord avec ceux de Fisher, montrèrent que les LDL de plus faibles densités avaient tendance à être retrouvées dans la fraction de hautes densités suite à leur injection et semblaient être le principal précurseur des LDL de densités supérieures. Les LDL de hautes densités, quant à elles, ne furent pratiquement jamais retrouvées dans la fraction de faibles densités, suggérant un métabolisme unidirectionnel des LDL vers des particules de densités toujours supérieures. Toutefois, cette relation ne fut pas observée chez les individus HF, chez qui les LDL de faible et haute densités montraient un métabolisme presque identique. Ceux-ci expliquèrent cette observation par le fait que les individus HF présentent habituellement une population beaucoup plus homogène de LDL en terme de densité, homogénéité qui est susceptible aussi de se refléter au plan métabolique.

Deux autres études réalisées au cours des années 1990 à l'aide de radio-isotopes chez des individus normolipidémiques, hypercholestérolémiques ou présentant une hyperlipidémie combinée ont généré des conclusions appuyant celle des deux études présentées précédemment, soit que les LDL de faible densité montraient un métabolisme accéléré comparativement au LDL de densités supérieures (510, 511). Une seule étude de la cinétique de différentes sous-classes de LDL jusqu'à maintenant a été réalisée à l'aide d'isotopes stables. Campos et coll. en 1997, démontrèrent par infusion constante de ²H₃-leucine chez 8 femmes post-ménopausées normolipidémiques que le taux de renouvellement des LDL de faibles densités était supérieur à celui des LDL de plus hautes densités ($0,59 \pm 0,21$ vs $0,41 \pm 0,16$ pool/jour) (349). Cependant, selon le modèle complexe qu'ils utilisèrent, 85 à 90 % des LDL de faibles densités étaient éliminées directement de la circulation, alors que 80 % des LDL de hautes densités trouvaient leur origine dans

l'hydrolyse des IDL. Étant donné que cette dernière étude misait sur le marquage endogène par infusion constante de traceur sur une période de 13 heures seulement, la présence de la relation précurseur-produit entre les sous-classes de LDL et les IDL ne pouvait être directement évaluée par l'examen des courbes d'enrichissement. La divergence partielle des conclusions obtenues lors de cette étude comparativement aux études précédentes pourrait donc provenir du choix de méthodologie et de l'information cinétique relativement limitée procurée par l'infusion constante de traceur sur une courte période de temps.

Les études qui ont opté pour l'analyse globale de différentes fractions de LDL ont démontré que le métabolisme intravasculaire des LDL est caractérisé par un certain degré de complexité, fait qui a rarement été considéré par la plupart des études de la cinétique de l'apoB-100. Le remodelage des LDL de faible densité apparaît, selon les études citées, comme une étape déterminante dans le catabolisme des LDL. Cette étape pourrait être d'une importance encore plus grande dans certaines conditions métaboliques. Par exemple, chez les individus HF caractérisés par une absence complète ou partielle du récepteur des LDL, le remodelage adéquat des LDL pourrait revêtir une importance accrue dans l'éventualité où certains mécanismes compensatoires pourraient être sensibles à la densité des particules. Toutefois, la grande majorité des études de la cinétique des sous-classes individuelles de LDL ont été réalisées à l'aide de traceurs radio-isotopiques, et peu de données convaincantes proviennent de données obtenues par marquage endogène à l'aide d'isotopes stables.

3.7 Cinétique de la CRP

Très peu d'information est disponible sur le métabolisme intravasculaire de la CRP. À date, un nombre très restreint d'études de cinétique ont été menées chez le rat (512), la souris (512, 513), le lapin (514, 515) et l'humain (516). Ces études, toutes réalisées à l'aide de CRP marquée à l'aide de radio-isotopes (iode¹²⁵), ont montré le caractère monoexponentiel de la clairance de la CRP, suggérant la présence d'un seul pool homogène intravasculaire. Il fut également démontré que le taux de catabolisme moyen de la CRP chez tous les organismes étudiés était relativement constant indépendamment de la présence ou non d'une condition inflammatoire aiguë. Chez l'humain, Vigushin et coll. ont estimé le taux de

renouvellement de la CRP circulante à 0.9 pool/j, taux qui demeurerait sensiblement le même autant chez les individus sains que chez les individus en phase aiguë de l'inflammation (516). L'absence de variation du taux de catabolisme de la CRP, même en phase aiguë de l'inflammation, fut notée chez toutes les espèces étudiées. Rowe et coll. ayant préalablement observé la capacité de la CRP à se lier aux lipoprotéines circulantes ont examiné la cinétique de la CRP chez des lapins hypercholestérolémiques et n'ont noté aucun effet significatif de la présence de concentrations accrues d'apoB sur le taux de catabolisme de la CRP (515). De façon similaire, Baltz et coll. ont remarqué, chez le rat et la souris, que le fait d'injecter la CRP préalablement complexée au polysaccharide-C n'avait aucun impact sur son métabolisme intravasculaire (512). Enfin, ces études montrèrent aussi de façon constante que lors de la réponse inflammatoire aiguë que la CRP ne semblait pas se déposer ou s'agréger aux foyers d'inflammation, mais semblait plutôt être confinée au compartiment vasculaire et se distribuer à la grandeur de l'organisme.

À l'exception peut-être des études de Rowe et coll. chez des lapins hypercholestérolémiques (515), aucune étude n'a examiné le métabolisme intravasculaire de la CRP en lien avec les différentes anomalies physiologiques qui caractérisent le syndrome métabolique. De plus, malgré l'ubiquité et la conservation phylogénique de la CRP à travers les espèces, la CRP ne se comporterait comme une protéine de la phase aiguë de l'inflammation que chez l'humain, le singe et le lapin. Ceci met largement en perspective les observations provenant d'études ayant utilisé le rat et la souris comme modèle expérimental. Donc, dans l'ensemble, les études revues précédemment mettent surtout en évidence le manque flagrant de données scientifiques concernant le métabolisme intravasculaire de la CRP chez l'humain. Considérant que la CRP est présentement considérée comme un outil clinique prometteur dans la détection des individus à risque de MCV et de diabète de type 2, des études devront être menées afin de comprendre les mécanismes physiologiques qui sous-tendent les concentrations plasmatiques de CRP associées au développement de ces deux pathologies.

Chapitre 4. Problématique

L'objectif général des travaux qui composent la présente thèse était de mettre à profit les techniques de traçage des protéines afin d'explorer in vivo chez l'humain les mécanismes physiologiques impliqués dans le développement de la dyslipidémie athérogène et de l'inflammation, deux composantes centrales au syndrome métabolique.

4.1 Apolipoprotéine C-III

L'hypertriglycéridémie est une composante importante de la dyslipidémie athérogène (179). L'étroite relation unissant l'apoC-III et la triglycéridémie a été exposée au cours des sections 2.1 et 3.5. L'apoC-III est présente sous trois isoformes en circulation, et les rares données scientifiques disponibles sur les propriétés métaboliques de chacun de ses isoformes suggèrent que celles-ci pourraient être impliquées différemment dans le développement de la dyslipidémie athérogène. En ce sens, des études ont démontré l'affinité accrue de l'apoC-III₂ pour les VLDL (271) et la présence excessive d'apoC-III₂ dans certains cas d'hypertriglycéridémies sévères (314, 315). Ces observations suggèrent donc que cette isoforme de l'apoC-III pourrait être particulièrement impliquée dans le développement de certaines des anomalies lipidiques associées au syndrome métabolique. Les études de cinétique récentes de l'apoC-III réalisées par marquage endogène à l'aide de ²H₃-leucine ont montré de façon constante que l'hypertriglycéridémie observée dans le contexte de l'obésité et du syndrome métabolique était intimement liée à une production accrue, et dans une moindre partie, un catabolisme réduit de l'apoC-III (470, 473). Cependant, la totalité de ces études se sont uniquement attardées à la cinétique de l'isoforme prédominante mono-sialylée de l'apoC-III.

Le premier objectif spécifique des présents travaux était d'examiner, in vivo chez l'humain, le métabolisme intravasculaire de chacune des isoformes de l'apoC-III et d'examiner les associations métaboliques unissant la cinétique de chacune de ses isoformes aux autres composantes du syndrome métabolique. Ce premier objectif a été réalisé au cours d'une

étude dont les résultats sont présentés dans l'article scientifique qui constitue le 5^e chapitre de la présente thèse.

4.2 Hétérogénéité des LDL

Les LDL sont une classe hétérogène de lipoprotéines en termes de diamètre et de densité (327). Le potentiel athérogénique accru des LDL de haute densité est supporté par des données provenant de plusieurs études épidémiologiques prospectives (338, 344, 517). L'augmentation des concentrations plasmatiques d'apoB-100 et de triglycérides associée au syndrome métabolique constitue un contexte physiologique favorable à la formation de LDL denses. Il est présentement proposé que le potentiel athérogénique accru des LDL denses pourrait en partie provenir de leur temps de résidence prolongé en circulation (344), ce qui aurait pour effet d'augmenter leur probabilité d'être séquestrées en certains foyers vasculaires propices à l'infiltration des lipoprotéines. Jusqu'à maintenant peu d'études de cinétique ont examiné simultanément le métabolisme de plusieurs sous-classes de LDL in vivo chez l'humain à l'aide d'isotopes stables. De celles-ci, aucune n'a investigué le métabolisme des sous-classes de LDL en lien avec leur diamètre. De plus, aucune n'a examiné in vivo les facteurs métaboliques possiblement associés à la cinétique des différentes sous-classes de LDL.

Le second objectif spécifique des présents travaux était d'examiner, in vivo chez l'humain, le métabolisme intravasculaire de l'apoB-100 en portant une attention particulière au métabolisme de différentes sous-classes de LDL. Cette étude avait comme objectifs principaux de déterminer la cinétique des LDL en lien avec leur diamètre et de définir les composantes du syndrome métabolique susceptibles d'influencer cette relation. Ce second objectif a été réalisé au cours d'une étude dont les résultats sont présentés dans l'article scientifique qui constitue le 6^e chapitre de la présente thèse.

4.3 Protéine C-réactive

L'importance de la composante inflammatoire dans le processus athérosclérotique et le développement de la MCV est supportée par les études ayant examiné l'anatomie des lésions athéromateuses et la mécanistique de leur progression (366). La totalité des études

épidémiologiques appuient indirectement ces observations en démontrant qu'une condition inflammatoire chronique de faible intensité reflétée par des concentrations plasmatiques relativement élevées de CRP serait associée à un risque accru de MCV (404). Des concentrations plasmatiques élevées de CRP ont été observées de façon répétitive chez les individus atteints du syndrome métabolique (412-414). L'information clinique apportée par la mesure des concentrations plasmatiques de CRP compléterait de façon significative l'information fournie par les algorithmes traditionnels et les composantes du syndrome métabolique dans l'estimation du profil de risque de MCV et de diabète de type 2 (430). Le rôle de la CRP dans la réponse inflammatoire chez l'humain est cependant encore largement obscur (381). Une seule étude à ce jour a investigué le métabolisme intravasculaire de la CRP *in vivo* chez l'humain dans différents contextes d'inflammation aiguë à l'aide de radio-isotopes (516). Aucune étude n'a examiné la cinétique intravasculaire de la CRP à l'aide d'isotopes stables. De plus, l'influence des différents facteurs de risque du syndrome métabolique sur le métabolisme *in vivo* de la CRP n'a jamais été investiguée.

Le troisième et dernier objectif spécifique des présents travaux était donc de caractériser, à l'aide d'isotopes stables, la cinétique *in vivo* de la CRP chez l'humain et d'examiner comment les différents facteurs de risque du syndrome métabolique pourraient être associés aux mécanismes physiologiques soutenant les concentrations plasmatiques de CRP. Un objectif secondaire de cette étude était d'examiner comment les concentrations plasmatiques d'IL-6 et d'adiponectine, deux adipokines aux effets inflammatoires opposés, pouvaient être associées à la cinétique intravasculaire de la CRP. Ce troisième objectif a été réalisé au cours d'une étude dont les résultats sont présentés dans l'article scientifique qui constitue le 7^e chapitre de la présente thèse.

Chapitre 5. Isoformes de l'apolipoprotéine C-III : cinétique et implication respective dans le métabolisme des lipoprotéines

Jean-François Mauger, Patrick Couture, Nathalie Bergeron, Benoît Lamarche

Journal of Lipid Research. 2006; 47 : 1212-18

Résumé

L'objectif de l'étude qui compose ce chapitre était d'examiner, par infusion constante de $^2\text{H}_3$ -leucine, la cinétique des différents isoformes de l'apoC-III et leurs associations avec certains paramètres du métabolisme lipidique. Les isoformes prédominants, apoC-III₁ et apoC-III₂, montraient un taux de production (PR) similaire (moyenne±écart-type, 1.22±0.49 mg/kg/j vs. 1.15±0.59 mg/kg/j respectivement) et un taux de catabolisme (FCR) similaire (0.51±0.13 pool/j vs. 0.61±0.24 pool/j respectivement). L'isoforme non-sialylé (ApoC-III₀) montrait un PR réduit de 80% (0.25±0.12 mg/kg/j) et un FCR réduit de 60% (0.21±0.07 pool/j) ($P<0.0001$ comparativement aux apoC-III₁ et apoC-III₂). Le PR de tous les isoformes étaient corrélés aux concentrations plasmatiques de triglycérides (C-III₁ et C-III₂ $r>0.8$, $P<0.0001$; C-III₀, $r=0.54$, $P<0.05$). Une forte corrélation fut observée entre le PR de l'apoC-III₂ et la proportion de petites LDL circulantes ($<255\text{Å}$) ($r=0.72$, $P=0.002$). Ces résultats suggèrent que l'ensemble des isoformes de l'apoC-III serait associé à la triglycéridémie et que l'apoC-III₂ pourrait jouer un rôle substantiel dans la formation des LDL denses.

Apolipoprotein C-III isoforms: kinetics and relative implication in lipid metabolism

Jean-François Mauger¹, Patrick Couture², Nathalie Bergeron³, Benoît Lamarche¹

From the ¹Institute on Nutraceuticals and Functional Foods, Laval University, Québec, Canada, ²Lipid Research Center, Laval University Medical Center, Québec, Canada and ³Department of Food Sciences and Nutrition, Laval University, Québec, Canada.

Benoît Lamarche is Chair Professor in Nutrition, Functional Food and Cardiovascular Health from the Canada Research Chair Program. Jean-François Mauger is a recipient of studentship from the Canadian Institutes for Health Research. Patrick Couture is a clinical-scientist supported by the Fonds de la recherche en Santé du Québec.

Running title: ApoC-III isoform kinetics and lipid metabolism

Address for correspondence:

Benoît Lamarche, PhD

Institute on Nutraceuticals and Functional Foods

2440 Boul Hochelaga, local 2742

Université Laval

Québec, Canada, G1K 7P4

Tel : 418-656-3527

Fax :418-656-5877

E-mail :benoit.lamarche@inaf.ulaval.ca

Abstract

Apolipoprotein C-III (apoC-III) production rate (PR) is strongly correlated to plasma triglyceride (TG) levels. ApoC-III exists in three different isoforms according to the sialylation degree of the protein. We investigated the kinetics and respective role of each apoC-III isoform in modulating intravascular lipid/lipoprotein metabolism. ApoC-III kinetics were measured in a sample of 18 healthy men [mean age (\pm SD) 42.1 \pm 9.5 years, body mass index 29.8 \pm 4.6 kg/m²] using a primed-constant infusion of L-(5,5,5-D³) leucine for 12 hours. Mono-sialylated and di-sialylated apoC-III (Apo-CIII₁ and apoC-III₂) exhibited similar PR (means \pm SD, 1.22 \pm 0.49 mg/kg/d vs. 1.15 \pm 0.59 mg/kg/d respectively) and similar fractional catabolic rate (FCR, 0.51 \pm 0.13 pool/d vs. 0.61 \pm 0.24 pool/d respectively). Non-sialylated apoC-III (ApoC-III₀) had an 80% lower PR (0.25 \pm 0.12 mg/kg/d) and a 60% lower FCR (0.21 \pm 0.07 pool/d) (P <0.0001 for comparison with CIII₁ and CIII₂ isoforms). The PR of apoC-III₁ and apoC-III₂ were more strongly correlated with plasma TG levels (r >0.8, P <0.0001) than was apoC-III₀ PR (r =0.54, P <0.05). Finally, the PR of apoC-III₂ was strongly correlated with the proportion of LDL<255 Å (r =0.72, P =0.002). These results suggest that all apoC-III isoforms, especially the predominant CIII₁ and CIII₂ isoforms, contribute to hypertriglyceridemia and that apoC-III₂ may play a significant role in the expression of the small dense LDL phenotype.

Keywords: VLDL metabolism, metabolic syndrome, triglycerides, LDL particle size, apolipoprotein C-III sialylation

Introduction

Emphasis is continuously put on plasma triglyceride (TG) levels as a key correlate of many features of the metabolic syndrome such as abdominal obesity, type 2 diabetes, lower levels of anti-atherogenic high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and higher levels of triglyceride rich lipoproteins (TRLs) (1-3). Increased concentrations of plasma triglycerides are also thought to promote the expression of the type B low-density lipoprotein (LDL) phenotype, characterized by the predominant presence of more atherogenic, small, dense LDL particles (4;4;5). In that context, there is a renewed interest in better understanding the mechanisms modulating plasma TG levels.

Apolipoprotein C-III (apoC-III) is a protein secreted mostly by the liver and, to a lesser extent, by the intestine (3). In circulation, it is associated with both TRL and HDL (6). ApoC-III is present in three isoforms that are termed apoC-III₀, apoC-III₁ and apoC-III₂ depending on the number of sialic acid molecules (0 to 2) terminating the oligosaccharidic portions of the protein (7). Each isoform has been shown to contribute respectively to approximately 10%, 55% and 35% of the total apoC-III levels in circulation (8). Total plasma apoC-III levels have been identified as a major determinant of triglyceridemia (9). Proposed mechanisms underlying the hypertriglyceridemic effect of apoC-III comprise inhibition of lipoprotein lipase (LPL) activity, disruption of the interaction of TRLs with vessel wall heparan sulfate proteoglycans and lower clearance of apoB-containing lipoproteins by LDL and LDL-related receptors (10-12).

The human *in vivo* kinetics of apoC-III has recently been studied in both healthy and hypertriglyceridemic individuals using stable isotopes. These studies have been relatively consistent in revealing that plasma apoC-III pool size (PS) and production rate (PR), rather than plasma apoC-III fractional catabolic rate (FCR), were the major determinants of plasma TG levels (13). Other studies have also indicated that apoC-III concentrations and PR were strongly and positively associated with increased production rate of VLDL-TG (14). It must be stressed that these previous studies have only investigated the kinetics of the predominant apoC-III isoform (apoC-III₁). To the best of our knowledge, no study to date has investigated the contribution of the other C-III isoforms to triglyceridemia and other dyslipidemic features of the metabolic syndrome, despite their significant

contribution to the total apoC-III pool size. Furthermore, despite the extensively described, strong negative relationship between TG levels and LDL particle size, no study yet has examined the impact of apoC-III isoform kinetics and distribution on LDL particle size.

The purpose of the present study was to compare the kinetics of each apoC-III isoform in order to determine their respective implication in lipid/lipoprotein metabolism and to evaluate their contribution to the expression of the small, dense LDL phenotype.

Methods

Subjects

Eighteen Caucasian men aged 42.1 ± 9.5 years with a mean body mass index (BMI) of 29.8 ± 4.6 kg/m², nonsmokers, normoglycemic, normolipidemic, and free of any thyroid, endocrine, cardiovascular, hepatic, or renal disorders were recruited in the Québec City area. Subjects who experienced significant gain or loss of weight (> 3 kg) in the 2 months preceding the study, who had excessive alcohol intake (> 30 g/day), had taken drugs, or had unusual dietary habits were excluded. Macronutrient intake as assessed by a 3 day food record obtained before the study (2 week days and 1 weekend day) was comparable between subjects (data not shown). All subjects gave informed consent and the study protocol was accepted by the Clinical Research Ethical Committee of Laval University.

Lipid profile

Plasma and HDL lipid concentrations were measured by enzymatic methods on a Technicon RA-500 analyzer (Bayer Corp., Tarrytown, NY) as previously described (15). Plasma VLDL ($d < 1.006$ g/ml) was isolated by ultracentrifugation and the HDL fraction was obtained after precipitation of LDL in the infranatant ($d > 1.006$ g/ml) with heparin and MnCl₂. The cholesterol, TG, and phospholipid content of the infranatant fraction was measured before and after the precipitation step. Plasma apoA-I and VLDL-apoB-100 concentrations were measured by nephelometry (16) and apoB-100 concentrations of IDL and LDL fractions were obtained by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (cardioCHEK, alerchek, Portland, ME).

Kinetic studies

Kinetics of apoC-III were determined using a primed-constant infusion of [5, 5, 5,⁻²H₃]-L-leucine carried out for 12 hours as described previously (17). Subjects were studied in the constantly fed-state to mimic the postprandial state. Every 30 min during the 3 hours that preceded the infusion, as well as during the 12-hour infusion (total of 15 hours), subjects received a meal consisting of 1/30th of their daily caloric intake. The bolus dose and injection rate of [5, 5, 5,⁻²H₃]-L-leucine were calculated on the basis of subject's weight

(10 μ mol/kg and 10 μ mol/kg/hour respectively). Blood samples (20 ml) were collected via a second intravenous line into vacutainer tubes containing EDTA (to a final concentration of 0.1%) at times 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 hour.

ApoC-III isoform isotopic enrichment determination

ApoC-III was isolated from the $d < 1.25$ g/ml plasma fraction obtained after centrifugation of whole plasma for 48 hours at 50 000 rpm at 4°C in a Beckman 50.4 Ti rotor. The infranatant was then dialysed overnight in an NaCl-Tris-base EDTA buffer, incubated with cysteamine for 4 hours at 37°C and delipidated using acetone-ethanol and diethyl ether as described previously (18). All apolipoproteins were then separated using preparative isoelectric focusing (IEF) on polyacrylamide-urea gels (pH gradient 4-7). Protein bands were revealed with Coumassie blue and gels were scanned and analyzed using Imagemaster 1-D Prime computer software (Amersham Pharmacia Biotech). The proportion of the area under the curve associated with each of the isoforms on the densitometric scan was used to derive the specific isoform concentrations as described previously in (19). After analysis, bands were excised and hydrolyzed in 6 N HCL at 110°C for 24 hours. Free amino acids in the hydrolysate were then derivatized by treatment with trifluoroacetic acid and trifluoroacetic acid anhydride at 110°C (20). The derivatized amino-acids were extracted into benzene and analysed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GC 6890N, MS 5973N Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Amino-acids were ionized by methane-negative chemical ionization and selective ion monitoring at $m/z=212$ and 209 was used to determine the isotopic ratio (deuterated/non-deuterated leucine) for each sample. Tracer-to-tracee ratios were calculated from the isotopic ratio using the formula described previously (21).

ApoB-100 isotopic enrichment determination

The VLDL ($d < 1.006$ g/ml, 18 hours at 312,000g) and IDL ($d = 1.006-1.019$ g/ml, 18 hours at 312,000g) fractions were isolated from fresh plasma by sequential ultracentrifugation and analyzed as described previously (21).

Kinetic analysis

The FCR of apoA-I, apoB-100 and each apoC-III isoform was determined by fitting the tracer to tracee ratio to a monoexponential function using the SAAMII Program software (University of Washington, Department of Bioengineering, Seattle, WA). Data were fitted to the mathematical function $Z(t) = Z_p(1 - e^{-k(t-d)})$ where $Z(t)$ is the tracer to tracee ratio at time t , Z_p is the tracer to tracee ratio corresponding to the plateau of the curve representing the precursor amino acid pool, d is the delay time in hours, and k is the FSR in pools per hour. The enrichment plateau of VLDL apoB-100 with deuterium-labeled leucine was used as the forcing function for precursor pool enrichment. Absolute PR was calculated (in mg/kg/d) using the formula:

$$PR = \frac{\text{FSR (pools/day)} \times \text{plasma apolipoprotein pool size (mg)}}{\text{body weight (kg)}}$$

Pool sizes were calculated as the plasma concentration of each apoC-III (mg/l) multiplied by estimated plasma volume (value fixed at 0.045 l/kg body weight).

LDL particle size characterization

LDL size phenotype was characterized using nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis of whole plasma along with standards of known diameter as previously described (22).

Statistical analysis

Data were analyzed using SAS (version 8.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC). Correlations were examined using Spearman rank correlations and the Student paired T test procedure was used for comparison of the kinetic parameters of the different ApoC-III isoforms.

Results

Study subjects

The physical characteristics and plasma lipid/lipoprotein profiles of the study subjects are presented in **Table 5.1**. Participants were aged 42.1 ± 9.5 year with most of them (15/18) being either overweight ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$, 7 subjects) or obese ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$, 8 subjects). As a group, study subjects had relatively normal plasma triglyceride and HDL-C levels ($1.67 \pm 0.97 \text{ mmol/l}$ and $1.13 \pm 0.23 \text{ mmol/l}$ respectively) and near normal total and LDL cholesterol levels ($5.05 \pm 1.15 \text{ mmol/l}$ and $3.28 \pm 0.97 \text{ mmol/l}$ respectively).

Concentrations and proportions of apolipoprotein C-III isoforms

Mean fasting (\pm SD) concentrations of apoC-III₀, apoC-III₁ and apoC-III₂ were $26.1 \pm 10.2 \text{ mg/l}$, $54.0 \pm 20.7 \text{ mg/l}$ and $39.9 \pm 17.2 \text{ mg/l}$ respectively ($P < 0.0001$ for comparison between isoforms), reflecting respective mean proportions of $22.0 \pm 2.0\%$, $45.0 \pm 2.9\%$ and $33.0 \pm 3.7\%$ of total apoC-III ($P < 0.0001$ for comparison between isoforms). No relationship was observed between anthropometric variables such as body mass index, waist circumference and weight and inter-individual variations in the proportion of apoC-III isoforms. Significant positive correlations were observed between BMI, visceral adiposity measured by standardized axial tomography as described previously in (23) and plasma concentrations of apoC-III₁ ($r = 0.59$, $P = 0.01$ and $r = 0.57$, $P = 0.02$ respectively) but not with the other two isoforms.

Kinetics of apolipoprotein C-III isoforms

Enrichment curves of the three apoC-III isoforms in deuterated leucine overtime are depicted in **Figure 5.1**. Non-sialylated ApoC-III (ApoC-III₀) was characterized by a slower enrichment rate compared with both apoC-III₁ and apoC-III₂ isoforms, which exhibited relatively similar enrichment rates. **Table 5.2** shows the calculated kinetic parameters for the different apoC-III isoforms. ApoC-III₀ was the isoform with the lowest PR and FCR ($P > 0.0001$ compared with the other two isoforms) whereas apoC-III₁ and apoC-III₂ exhibited relatively similar kinetics.

ApoC-III isoforms and plasma lipids and lipoproteins

Correlations between apoC-III isoform kinetics and plasma lipids are shown in **Table 5.3**. The PSs and PRs of all apoC-III isoforms, but not the FCRs, were highly and positively correlated with VLDL-triglycerides and VLDL-cholesterol levels. HDL-cholesterol levels were inversely associated with all apoC-III isoform PSs and PRs

The relationship between apoC-III isoform kinetics and apoB-100 and apoA-I kinetics were also investigated. While the PS of the three apoC-III isoforms were strongly and inversely correlated with VLDL apoB-100 FCR, only the PS and concentrations of apoC-III₀ and apoC-III₁ showed significant positive relationships with the FCR of IDL apoB-100. The PSs of all apoC-III isoforms were strongly correlated with the apoB-100 PSs of all apoB-100-containing fractions, including LDL (LDL apoB-100 PS vs. apoC-III₀ PS: $r=0.58$ [$P=0.0187$], vs. apoC-III₁ PS: $r=0.63$ [$P=0.009$], vs. apoC-III₂ PS: $r=0.64$ [$P=0.0082$]). There was no relationship between apoC-III kinetics and apoA-I FCR or PR, but a surprising positive association was found between all apoC-III isoform PSs and apoA-I PS.

ApoC-III isoforms and LDL particle size

The relationship between apoC-III isoform kinetics and LDL particle size was also investigated. Significant negative correlations were observed between the three apoC-III isoform PSs and LDL peak particle size (data not shown), but only the concentrations of apoC-III₂ were significantly associated with LDL peak particle size ($r=-0.57$, $P=0.02$) and the proportion of LDL <255 Å ($r=0.56$, $P=0.02$). Furthermore, as depicted in **Figure 5.2**, only the apoC-III₂ PR showed a significant association with LDL peak particle size. This relationship remained highly significant when adjusted for plasma TG levels ($P=0.011$).

Discussion

All recent studies that have investigated apoC-III kinetics using stable isotopes have limited their analysis to the predominant mono-sialylated isoform of the peptide and only a few studies, performed with radioisotopes (24-26) have considered both the mono-sialylated and di-sialylated isoforms. To the best of our knowledge, no study has yet compared the association between each of the three apoC-III isoforms and circulating lipid levels and apolipoprotein B-100 and A-I kinetics. Consequently, the purpose of the present study was to examine the extent to which each apoC-III isoform correlates with variations in lipoprotein/ lipid metabolism. Also, because LDL particles are the end product of the lipoprotein hydrolysis pathway and because their size is tightly correlated with triglyceridemia, we also investigated the relationship between apoC-III isoform kinetics and LDL electrophoretic characteristics.

In the present study, non-, mono- and di-sialylated apoC-IIIs respectively accounted for approximately 22%, 45% and 33% of the total circulating apoC-III pool, which is concordant with previous data reporting isoform relative proportions of 15%, 55% and 35%, respectively (27). Although BMI and visceral fat correlated with plasma apoC-III₁ concentrations, no correlation was observed between the relative proportion of each isoform and anthropometric variables such as visceral adipose tissue, weight and BMI. This suggests that the degree of sialylation of apoC-III may not be related to plasma lipid levels or obesity indices, or vice-versa.

We observed that the less predominant isoform of apoC-III, apoC-III₀, had a significantly slower PR and FCR compared with the predominant apoC-III₁ and apoC-III₂ isoforms. Studies performed by Huff et al. in the early 1980's using radioisotopes suggested that the mono- and di-sialylated isoforms of apoC-III had similar clearance rates from the circulation (0.648 pool/day and 0.624 pool/day, respectively) (24). The FCR values of apoC-III₁ and apoC-III₂ measured using stable isotopes in the present experiments were in the same range as those obtained using radioisotopes (0.509 pool/d and 0.615 pool/day, respectively). In our study the difference between apoC-III₁ and apoC-III₂ FCRs was almost statistically significant (t-test P=0.14). This suggests possible subtle differences in

underlying mechanisms of clearance, which contradicts the hypothesis of a common clearance pathway for both isoforms, as proposed by Huff et al. (24).

Clearance pathways for apoC-III are largely unknown. No correlation was found between apoC-III isoform FCR and the FCR of apoB-100 in VLDL and IDL. This result, along with the observation that the FCR of apoB-100 in VLDL (8.5 ± 5.4 pools/day) and IDL (6.6 ± 4.6 pools/day) are more than 10 times greater than the highest FCR value among apoC-III isoforms (apoC-III₂, 0.615 ± 0.236 pool/day), suggests that the intravascular catabolism of apoC-III may be independent of apoB-100. On the other hand, a correlation trend was observed between apoC-III₀ and apoC-III₁ FCRs and apoA-I FCR. This observation suggests that the non- and mono-sialylated isoforms of apoC-III may be preferentially cleared from the circulation through pathways that are shared with apoA-I, although this hypothesis remains to be formally tested.

The sialylation of proteins, and especially of apolipoproteins, is poorly understood. Apolipoprotein sialylation is an intracellular process driven by a family of Golgi-membrane bound enzymes known as sialyltransferases (28). The proposed functions of sialylation include stabilization of protein conformation, resistance to protease, charge, protein targeting and developmental regulation (29). Despite the fact that neuraminidase, the lysosomal enzyme responsible for the specific removal of sialic acid residues of sialylated proteins, has been detected in the circulation, it is thought that no desialylation occurs in the plasma because the optimal pH for the reaction ranges between 4 and 5 (30). It is therefore most likely that the low PR and FCR of apoC-III₀ compared with the two other isoforms may simply reflect the fact that only a limited amount of apoC-III avoids the sialylation process prior to its secretion in the circulation. This hypothesis would be concordant with data indicating that protein sialylation is a variable and non-obligatory step for further processing and secretion (30). On the other hand, the lower FCR of apoC-III₀ may be due to its relatively smaller pool size. Because apoC-III is known to exchange between lipoproteins, the smaller pool size of this isoform may reduce its probability of entering the catabolic pathways leading to its clearance compared with other more prevalent isoforms. The lack of evidence for a metabolic relationship between the different isoforms of apoC-III in circulation was the main reason that we did not model their kinetics together.

Previous work on apoC-III kinetics has emphasized the strong relationship between total plasma apoC-III₁ PS as well as PR and total plasma and VLDL-TG levels (13;31). The present study showed that this association was consistent for all three apoC-III isoforms. Indeed, the PSs and PRs of all apoC-III isoforms correlated positively with the PS of VLDL apoB-100 and negatively with the FCR of VLDL apoB-100. ApoC-III₁ PR and PS also correlated with the PS and PR of IDL apoB-100. The lack of association between apoC-III₂ and apoC-III₀ PR and IDL kinetics may be due to the smaller PS of these isoforms in relative terms, which in turn may limit their impact on remnant lipoprotein metabolism compared with apoC-III₁. These data suggest that all apoCIII isoforms may contribute to the inhibition of the LPL-mediated intravascular hydrolysis of TRL, resulting in a delayed catabolism of apoB-100 in the VLDL fraction, whereas only the predominant isoform, apoC-III₁, would be related to the metabolism of TRL remnants.

We also observed a significant positive correlation between the PS of all apoC-III isoforms and plasma apoA-I PS. This was surprising considering the strong relationships between apoC-III and plasma TG levels on the one hand, and the inverse relationship between TG levels and HDL-C on the other hand. However, almost 50% of apoC-III has been shown to be HDL-bound and a significant positive relationship between HDL apoC-III PS and HDL apoA-I PS has previously been reported by Cohn et al (32).

The strong correlation between plasma TG levels and LDL peak particle size has been extensively described (4;4;5). Our data suggest that the degree of sialylation of apoC-III may be an important modulator of LDL particle size. Very few experiments have been undertaken to elucidate the impact of the apoC-III degree of sialylation on lipoprotein/lipid metabolism. The contribution of the sialic acid content of apoC-III to the *in vitro* activity of the purported lipolysis stimulated receptor (LSR) of rat liver, which is thought to be involved in TRL clearance by hepatocytes has been studied previously. The study showed that although apoC-III₂ has an apparent 2-fold greater affinity for VLDL than do the other two apoC-III isoforms, its capacity to inhibit VLDL binding to LSR was almost 50% of that of the mono- and di-sialylated isoforms (33). It has also been demonstrated that hypertriglyceridemic subjects have a greater proportion of apoC-III in the di-sialylated isoform associated with VLDL (34). Another study reported that the apoC-III sialic acid

content had no impact on its ability to inhibit the LPL driven hydrolysis of lipoproteins (35). However, this later study only compared apoC-III₀ (neuraminidase treated apoC-III₁) with apoC-III₁.

To the best of our knowledge, none of the previous *in vitro* studies examined *per se* the impact of VLDL enrichment with apoC-III₂ on LPL driven hydrolysis. This leaves the possibility that VLDL with a higher content of apoC-III₂ may be less readily hydrolyzed by LPL compared with VLDL with a normal apoC-III₂/apoC-III₁ ratio, as suggested previously (34). Therefore, to possibly explain the strong relationship between apoC-III₂ concentrations and PR and small dense LDL particles, we hypothesize that apoC-III₂, because of its higher affinity for VLDL, may increase the VLDL apoC-III₂/apoC-III₁ ratio, thereby contributing to a greater inhibition of VLDL hydrolysis by LPL. This, in turn, would lead to a longer residence time of TRL and TRL remnants in the circulation and possibly to an increased cholesterol ester transfer protein-mediated transfer of triglycerides to HDL and LDL in exchange for cholesterol. Ultimately the TG content of LDL would most likely be hydrolyzed by hepatic triglyceride lipase to generate small dense LDL particles. On the basis of this hypothesis we would anticipate a stronger correlation between apoC-III₂ concentrations and VLDL-TG compared to other apoC-III isoforms, which was not observed in the present study. We believe that this may be partly explained by the fact that only relatively normolipidemic subjects were investigated. Information on the proportion of each isoform associated within VLDL would also have been potentially useful for further investigation of this hypothesis. Investigating a more heterogeneous group of normo- and hypertriglyceridemic subjects and quantifying the proportion of apoC-III isoforms associated with HDL and VLDL should therefore be the focus of future studies.

Previous experiments have suggested that a proportion of apoC-III may not be available for free transfer, or equilibration, between HDL and TRL when transiting between the fasting and fed states and vice-versa (36;37). To the best of our knowledge, the exchangeability of apoC-III in relation with its degree of sialylation has yet to be investigated. Because our study was performed using the total plasma lipoprotein fraction ($d < 1.25$ g/ml), it could not provide insightful information on the exchangeability of the different isoforms of apoC-III

between HDL and TRL. However, it remains possible that the sialylation degree of the various apoC-III isoforms, by determining their affinity for specific lipoproteins, may also modulate their rate of exchange between lipoproteins. Therefore, it is possible that apoC-III₂ may exchange less rapidly from VLDL, but this, again, warrants further investigation. Finally, it has been reported that some apoC-III may possibly be lost when lipoproteins are subjected to ultracentrifugation. Cohn et al. previously reported that the amount of apoC-III found in the bottom plasma fraction ($d > 1.21$ g/ml) after four sequential ultracentrifugation runs represented only 0.5% of total plasma apoC-III (38). On the basis of this finding, we assume that the single ultracentrifugation step in the present study was unlikely to have altered the relative proportions of each apoC-III isoform measured in the $d < 1.25$ g/ml fraction.

In conclusion, this study demonstrated that the kinetics of the two most predominant isoforms, apoC-III₂ and apoC-III₁, show the strongest associations with the expression of many features of the metabolic syndrome such as hypertriglyceridemia and reduced VLDL and IDL apoB-100 catabolism. ApoC-III₂ concentrations and kinetics were also the strongest correlate of the expression of the small dense LDL phenotype, despite the fact that it is not the most predominant isoform of the protein in circulation. This suggests that apoC-III₂ may have the most deleterious impact on LDL particle size, which is an important risk factor of cardiovascular disease.

Acknowledgements

JFM would like to express grateful thanks to Mrs Johanne Marin and Mr George Cousineau for their valuable help and relevant advice. This study has been supported in part by an operating grant from the Canadian Institutes for Health Research. JFM is a recipient of a studentship from the Canadian Institutes for Health Research. PC is a clinical scientist and is supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec

References

1. Ruotolo,G. and Howard,B.V. (2002) Dyslipidemia of the metabolic syndrome, *Curr. Cardiol. Rep.* 4, 494-500.
2. Chan,D.C., Barrett,H.P., and Watts,G.F. (2004) Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy, *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 4, 227-246.
3. van Dijk,K.W., Rensen,P.C., Voshol,P.J., and Havekes,L.M. (2004) The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism?, *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 239-246.
4. Katznel,L.I., Coon,P.J., Rogus,E., Krauss,R.M., and Goldberg,A.P. (1995) Persistence of low HDL-C levels after weight reduction in older men with small LDL particles, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 299-305.
5. McNamara,J., Jenner,J., Li,Z., Wilson,P., and Schaefer,E. (1992) Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration., *Arterioscler Thromb* 12, 1284-90.
6. Jong,M.C., Hofker,M.H., and Havekes,L.M. (1999) Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 472-484.
7. Ito,Y., Breslow,J.L., and Chait,B.T. (1989) Apolipoprotein C-III0 lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure, *J. Lipid Res.* 30, 1781-1787.
8. Juntti-Berggren,L., Refai,E., Appelskog,I., Andersson,M., Imreh,G., Dekki,N., Uhles,S., Yu,L., Griffiths,W.J., Zaitsev,S., Leibiger,I., Yang,S.N., Olivecrona,G., Jornvall,H., and Berggren,P.O. (2004) Apolipoprotein CIII promotes Ca²⁺-dependent beta cell death in type 1 diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10090-10094.

9. Gerritsen,G., Rensen,P.C., Kypreos,K.E., Zannis,V.I., Havekes,L.M., and Willems,v.D. (2005) ApoC-III deficiency prevents hyperlipidemia induced by apoE overexpression, *J. Lipid Res.* 46, 1466-1473.
10. Aalto-Setala,K., Fisher,E.A., Chen,X., Chajek-Shaul,T., Hayek,T., Zechner,R., Walsh,A., Ramakrishnan,R., Ginsberg,H.N., and Breslow,J.L. (1992) Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles, *J. Clin. Invest* 90, 1889-1900.
11. Ebara,T., Ramakrishnan,R., Steiner,G., and Shachter,N.S. (1997) Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E, *J. Clin. Invest* 99, 2672-2681.
12. Shachter,N.S. (2001) Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 297-304.
13. Cohn,J.S., Tremblay,M., Batal,R., Jacques,H., Rodriguez,C., Steiner,G., Mamer,O., and Davignon,J. (2004) Increased apoC-III production is a characteristic feature of patients with hypertriglyceridemia, *Atherosclerosis* 177, 137-145.
14. Cohn,J.S., Patterson,B.W., Uffelman,K.D., Davignon,J., and Steiner,G. (2004) Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 3949-3955.
15. Archer,W.R., Lamarche,B., Deriaz,O., Landry,N., Corneau,L., Despres,J.P., Bergeron,J., Couture,P., and Bergeron,N. (2003) Variations in body composition and plasma lipids in response to a high-carbohydrate diet, *Obes. Res.* 11, 978-986.
16. An,P., Rice,T., Gagnon,J., Borecki,I.B., Bergeron,J., Despres,J.P., Leon,A.S., Skinner,J.S., Wilmore,J.H., Bouchard,C., and Rao,D.C. (2000) Segregation analysis of

apolipoproteins A-1 and B-100 measured before and after an exercise training program: the HERITAGE Family Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 807-814.

17. Desroches,S., Paradis,M.E., Perusse,M., Archer,W.R., Bergeron,J., Couture,P., Bergeron,N., and Lamarche,B. (2004) Apolipoprotein A-I, A-II, and VLDL-B-100 metabolism in men: comparison of a low-fat diet and a high-monounsaturated fatty acid diet, *J. Lipid Res.* 45, 2331-2338.

18. Mauger,J.F., Couture,P., Paradis,M.E., and Lamarche,B. (2005) Comparison of the impact of atorvastatin and simvastatin on apoA-I kinetics in men, *Atherosclerosis* 178, 157-163.

19. Bugugnani,M.J., Koffigan,M., Kora,I., Ouvry,D., Clavey,V., and Fruchart,J.C. (1984) Rapid assessment of the distribution of apolipoproteins C-II and C-III subspecies in triglyceride-rich lipoproteins by isoelectric focusing, *Clin. Chem.* 30, 349-351.

20. Dwyer,K.P., Barrett,P.H., Chan,D., Foo,J.I., Watts,G.F., and Croft,K.D. (2002) Oxazolinone derivative of leucine for GC-MS: a sensitive and robust method for stable isotope kinetic studies of lipoproteins, *J. Lipid Res.* 43, 344-349.

21. Cobelli,C., Toffolo,G., and Foster,D.M. (1992) Tracer-to-tracee ratio for analysis of stable isotope tracer data: link with radioactive kinetic formalism, *Am J Physiol* 262, 968-75.

22. Mauger,J.F., Lichtenstein,A.H., Ausman,L.M., Jalbert,S.M., Jauhiainen,M., Ehnholm,C., and Lamarche,B. (2003) Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size, *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 370-375.

23. Archer,W.R., Lamarche,B., Deriaz,O., Landry,N., Corneau,L., Despres,J.P., Bergeron,J., Couture,P., and Bergeron,N. (2003) Variations in body composition and plasma lipids in response to a high-carbohydrate diet, *Obes. Res.* 11, 978-986.

24. Huff,M.W., Fidge,N.H., Nestel,P.J., Billington,T., and Watson,B. (1981) Metabolism of C-apolipoproteins: kinetics of C-II, C-III1 and C-III2, and VLDL-apolipoprotein B in normal and hyperlipoproteinemic subjects, *J. Lipid Res.* 22, 1235-1246.

25. Nestel,P.J., Huff,M.W., Billington,T., and Fidge,N.H. (1982) Changes in the plasma lipoprotein distribution of apolipoproteins C-II, C-III1, C-III2 and apolipoprotein B after heparin-induced lipolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 712, 94-102.
26. Huff,M.W. and Nestel,P.J. (1982) Metabolism of apolipoproteins CII, CIII1, CIII2 and VLDL-B in human subjects consuming high carbohydrate diets, *Metabolism* 31, 493-498.
27. Kashyap,M.L., Srivastava,L.S., Hynd,B.A., Gartside,P.S., and Perisutti,G. (1981) Quantitation of human apolipoprotein C-III and its subspecies by radioimmunoassay and analytical isoelectric focusing: abnormal plasma triglyceride-rich lipoprotein apolipoprotein C-III subspecies concentrations in hypertriglyceridemia, *J. Lipid Res.* 22, 800-810.
28. Harduin-Lepers,A., Vallejo-Ruiz,V., Krzewinski-Recchi,M.A., Samyn-Petit,B., Julien,S., and Delannoy,P. (2001) The human sialyltransferase family, *Biochimie* 83, 727-737.
29. Paulson,J.C. (1989) Glycoproteins - What Are the Sugar Chains for, *Trends in Biochemical Sciences* 14, 272-276.
30. Millar,J.S. (2001) The sialylation of plasma lipoproteins, *Atherosclerosis* 154, 1-13.
31. Cohn,J.S., Patterson,B.W., Uffelman,K.D., Davignon,J., and Steiner,G. (2004) Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 3949-3955.
32. Cohn,J.S., Batal,R., Tremblay,M., Jacques,H., Veilleux,L., Rodriguez,C., Mamer,O., and Davignon,J. (2003) Plasma turnover of HDL apoC-I, apoC-III, and apoE in humans: in vivo evidence for a link between HDL apoC-III and apoA-I metabolism, *J. Lipid Res.* 44, 1976-1983.
33. Mann,C.J., Troussard,A.A., Yen,F.T., Hannouche,N., Najib,J., Fruchart,J.C., Lotteau,V., Andre,P., and Bihain,B.E. (1997) Inhibitory effects of specific apolipoprotein

C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor, *J. Biol. Chem.* 272, 31348-31354.

34. Holdsworth,G., Stocks,J., Dodson,P., and Galton,D.J. (1982) An abnormal triglyceride-rich lipoprotein containing excess sialylated apolipoprotein C-III, *J. Clin. Invest* 69, 932-939.

35. Catapano,A.L. (1987) Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein C-II is modulated by the COOH terminal region of apolipoprotein C-III, *Chem. Phys. Lipids* 45, 39-47.

36. Tornoci,L., Scheraldi,C.A., Li,X., Ide,H., Goldberg,I.J., and Le,N.A. (1993) Abnormal activation of lipoprotein lipase by non-equilibrating apoC-II: further evidence for the presence of non-equilibrating pools of apolipoproteins C-II and C-III in plasma lipoproteins, *J. Lipid Res.* 34, 1793-1803.

37. Bukberg,P.R., Le,N.A., Ginsberg,H.N., Gibson,J.C., Rubinstein,A., and Brown,W.V. (1985) Evidence for non-equilibrating pools of apolipoprotein C-III in plasma lipoproteins, *J. Lipid Res.* 26, 1047-1057.

38. Batal,R., Tremblay,M., Barrett,P.H., Jacques,H., Fredenrich,A., Mamer,O., Davignon,J., and Cohn,J.S. (2000) Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects, *J. Lipid Res.* 41, 706-718.

Figure description

Figure 5.1: Modeled enrichment curves of the 3 apoC-III isoforms with deuterated leucine during the 12 hour constant infusion. The circles represent average tracer to tracee ratio for each given time point while the curves fit the values predicted by the model.

Figure 5.2: Relation between the production rate (PR) of each apoC-III isoform and LDL peak particle size.

Table 5.1: Characteristics of study subjects

variables	Mean \pm SD
N	18
Age (years)	42.1 \pm 9.5
Weight (Kilograms)	90.1 \pm 16.5
BMI (Kg/m ²)	29.8 \pm 4.6
Triglycerides (mmol/L)	1.67 \pm 0.97
Total Cholesterol (mmol/L)	5.05 \pm 1.15
LDL cholesterol (mmol/L)	3.28 \pm 0.97
HDL cholesterol (mmol/L)	1.13 \pm 0.23

Table 5.2: Plasma kinetics of each apoC-III isoform in the constantly fed state

Isoform	Concentration (mg/l)	Pool size (mg)	FCR (Pools/d)	PR (mg/kg/d)
apoC-III ₀	26.1 ± 10.2 ^a	107.4 ± 49.9 ^a	0.215 ± 0.068 ^a	0.250 ± 0.121 ^a
apoC-III ₁	54.0 ± 20.7 ^b	223.7 ± 105.7 ^b	0.509 ± 0.129 ^b	1.222 ± 0.487 ^b
apoC-III ₂	39.9 ± 17.2 ^c	164.7 ± 85.2 ^c	0.615 ± 0.236 ^b	1.150 ± 0.587 ^b

Values with different superscript are statistically different (P<0.0001)

FCR: Fractional catabolic rate

PR: Production rate

Table 5.3: Spearman correlation coefficient between apoC-III isoform kinetics and apolipoprotein metabolism and lipid levels

	VLDL		VLDL apoB-100			IDL		IDL apoB-100			HDL		HDL apoA-I		
	TG	Chol	PS	PR	FCR	TG	Chol	PS	PR	FCR	TG	Chol	PS	PR	FCR
PS															
apoC-III ₀	0.83 [†]	0.82 [†]	0.86 [†]	0.06	-0.56 [•]	0.27	-0.02	0.66 [*]	-0.05	-0.57 [•]	0.06	-0.58 [*]	0.51 [•]	-0.15	0.08
apoC-III ₁	0.84 [†]	0.81 [†]	0.88 [†]	0.04	-0.62 [*]	0.22	-0.07	0.71 [◇]	-0.05	-0.63 [*]	0.08	-0.51 [•]	0.58 [*]	-0.17	0.01
apoC-III ₂	0.87 [†]	0.89 [†]	0.82 [†]	0.18	-0.54 [•]	0.11	-0.04	0.77 [◇]	0.10	-0.42	0.27	-0.50 [•]	0.53 [•]	-0.09	-0.04
PR															
apoC-III ₀	0.54 [•]	0.53 [•]	0.47 [•]	0.32	-0.06	0.16	-0.09	0.18	-0.11	-0.14	-0.01	-0.55 [•]	0.00	0.28	0.51
apoC-III ₁	0.82 [†]	0.80 [†]	0.80 [†]	0.25	-0.44	0.31	0.09	0.61 [*]	0.00	-0.56 [•]	0.07	-0.65 [*]	0.32	0.01	0.21
apoC-III ₂	0.76 [◇]	0.72 [◇]	0.61 [*]	0.35	-0.23	-0.06	-0.08	0.50 [•]	0.16	-0.25	0.40	-0.56 [•]	0.21	0.36	0.34
FCR															
apoC-III ₀	0.05	0.10	0.05	0.12	0.07	0.00	-0.09	-0.11	-0.24	0.08	-0.18	-0.31	-0.12	0.27	0.45
apoC-III ₁	0.04	0.07	0.03	0.07	0.03	0.27	-0.03	-0.16	-0.26	-0.01	-0.30	-0.38	-0.26	0.13	0.42
apoC-III ₂	0.15	0.25	0.31	0.12	-0.26	-0.20	-0.35	0.21	-0.05	-0.16	0.21	-0.38	-0.03	0.14	0.34

Legend: [•] = P<0.05, ^{*} = P<0.01, [◇] = P<0.001, [†] = P<0.0001, PS: Pool size, PR: Production rate, FCR: Fractional catabolic rat

Figure 5.1

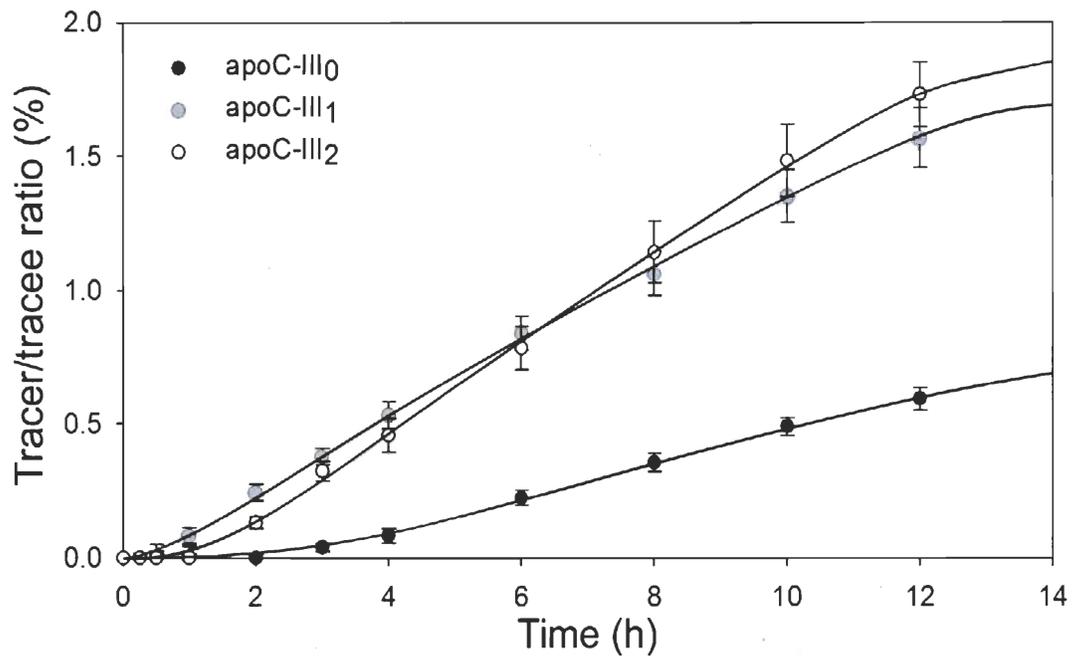
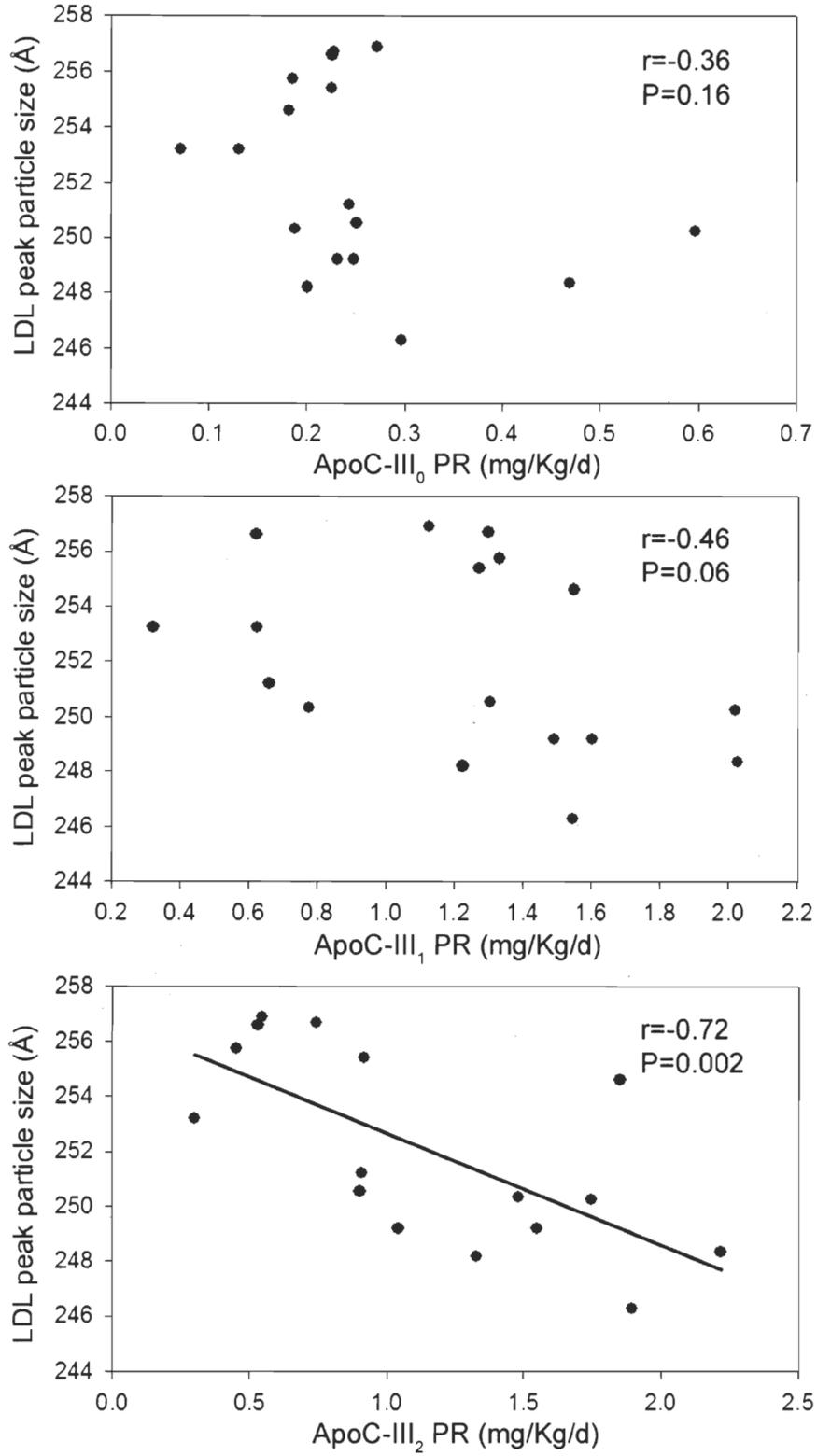


Figure 5.2



Chapitre 6. Étude de la cinétique intravasculaire des LDL de différentes tailles chez l'humain

Jean-François Mauger, Patrick Couture, Benoît Lamarche

Soumis à la revue Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Oct. 2008

Résumé

L'objectif de l'étude qui suit était de caractériser, à l'aide d'une impulsion isotopique de $^2\text{H}_3$ -leucine, l'impact de la taille des LDL sur la cinétique intravasculaire de l'apoB-100 dans différentes sous-classes de LDL définies en fonction de leur densité. Le FCR des LDL les moins denses (LDL-1, 7.71 ± 3.62 pools/j) était significativement plus élevé que le FCR des LDL de densité intermédiaire (LDL-2, 2.30 ± 1.26 pools/j) et de haute densité (LDL-3, 0.41 ± 0.09 pools/j) ($P < 0.05$ pour comparaison). Le FCR des LDL (toutes sous-classes confondues) était positivement associé au diamètre des LDL ($r = 0.56$, $P = 0.0008$). Cette association n'était cependant pas observée au sein des sous-classes individuelles de LDL. Le métabolisme des LDL-1 et LDL-2 était associé au métabolisme des triglycérides et leur élimination définitive de la circulation semblait impliquer leur conversion préalable en LDL-3. La cinétique des LDL-3 était peu influencée par les facteurs métaboliques mesurés. Des études devront être entreprises chez des individus métaboliquement détériorés afin de valider ces observations.

**Study of the intravascular kinetics of large and small LDL
using stable isotopes in humans***

Authors

Jean-François Mauger, Patrick Couture, Benoît Lamarche.

Affiliation

Institute on Nutraceuticals and Functional Foods, Laval University, Québec, Canada.

Address for correspondence:

Benoît Lamarche, PhD

Institute on Nutraceuticals and Functional Foods

2440 Boul. Hochelaga

Université Laval

Québec, Canada, G1V 0A6

Tel: 418-656-3527

Fax: 418-656-5877

Email: benoit.lamarche@inaf.ulaval.ca

* Tel que mentionné en page 3 de l'introduction générale, ceci constitue la première version de l'article soumis pour révision à *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. Le lecteur devrait donc se référer à la version publiée lorsque celle-ci sera disponible (probablement en 2010).

Abstract

Objective Our goal was to describe the kinetics of LDL subclasses based on size and density. **Methods and Results** Using a bolus injection of stable 5,5,5-²D₃-L-leucine and multi-compartmental modeling, the kinetic of apoB-100 in VLDL, IDL and three LDL density subclasses obtained by sequential density ultracentrifugation was investigated over a five-day period in 12 healthy men. The fractional catabolic rate (FCR) of buoyant LDL-1 (7.71 ± 3.62 pools/d) was significantly higher than the FCR of more dense LDL-2 (2.30 ± 1.26 pools/d) and LDL-3 (0.41 ± 0.09 pool/d) ($P < 0.05$ for comparison). In pooled data analysis, the FCR of total LDL apoB-100 was positively associated with LDL peak particle diameter ($r = 0.56$, $P = 0.0008$) but this association was not observed within individual LDL subclasses. LDL-1 and LDL-2 FCR were associated with indicators of plasma TG metabolism and were preferentially converted into LDL-3 rather than directly cleared from circulation. The kinetics of the small LDL-3 subfraction showed limited associations with metabolic parameters. **Conclusion** Our study revealed marked differences in the in vivo kinetics of small and large LDL in humans. Our results also suggest that the majority of large LDL have to be remodeled into smaller LDL prior to their definitive removal from circulation.

Introduction

It is now widely accepted that low-density lipoproteins (LDL) are a heterogeneous class of lipoproteins in terms of size and density. The small dense LDL (sdLDL) phenotype, often observed in conjunction with hypertriglyceridemia (1, 2), has been linked to an increased risk of cardiovascular disease (CVD) in many epidemiological studies (3). The increased atherogenicity of LDL has been attributed, in part, to their reduced affinity for the LDL receptor, their increased affinity for the extra-cellular matrix, their increased susceptibility to oxidation and to an increased residence time in the vasculature (4-7). Whether the size of the LDL particle has a direct impact in determining its clearance rate also remains controversial. On the one hand, studies that have compared the kinetics of different LDL subclasses using intravenous injection of LDL precursors either in the form of labeled amino acids or radio-labeled VLDL have been relatively consistent in showing that "light" LDL are metabolized faster than "heavy" LDL (8-13). It must be stressed that none of these previous studies have characterized the different LDL fractions according to size. On the other hand, Vega *et al.*, in the only study that used autologous radio-labeled LDL of different densities, showed that the plasma decay of specific activity in "light" LDL was less rapid than that of "heavy" LDL (14). Finally, other kinetic studies that addressed this issue indirectly by measuring the turnover of total LDL apoB-100 in individuals with different LDL size phenotypes have yielded conflicting results (15, 16). These inconsistencies among previous kinetic studies regarding the impact of particle size on the kinetics of LDL may be due to differences in methodologies as well as in subjects' characteristics. They also underscore our lack of understanding of the relationship between LDL size and their kinetics in humans and the need to develop new models to specifically address this problem.

To the best of our knowledge, this is the first study in humans to compare the kinetics of various LDL subclasses using integrated multicompartmental modeling of endogenously labeled LDL with a stable isotope. Specifically, the *in vivo* enrichment of apoB-100 after a single injection of (5,5,5)-²H-L-leucine was monitored over five days in five categories of apoB-100 containing lipoproteins, including three different LDL subclasses of

predetermined densities and known size. We also examined the associations between various metabolic risk factors for CVD and the kinetics of the different LDL subclasses.

Methods

Subjects

Twelve healthy men were recruited within Laval University working employees through e-mail announcements. Subjects with coronary heart disease or known major illness such as diabetes, monogenic dyslipidemias, renal or hepatic dysfunction or under medication known to affect lipid profile were not excluded. Subjects were asked to avoid alcohol consumption and strenuous physical activities 48 hour prior to and for the length of the kinetic study. The study protocol was approved by local ethics committee and all subjects gave informed written consent.

Kinetic analysis

On a Monday morning, following a 12-hour fast, study subjects were admitted to the Clinical Investigation Unit of the Institute on Nutraceuticals and Functional Foods. After anthropometric measurements, subjects received a single intravenous bolus of (5,5,5)-²H-Leucine (6.75 mg/kg body weight) via the antecubital vein of the dominant arm. Blood samples were drawn via an intravenous line secured in the antecubital vein of the non-dominant arm at fixed time points (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 33, 48, 72 and 96 hours) using vacutainer tubes containing EDTA to a final concentration of 0.1%. During the first day, subjects had to remain seated but had free access to water until the 12-hour time-point blood collection was made, after which a standard meal was provided. All subsequent blood samples were collected after at least 12 hour of fasting, except for the 33-hour time point, when subjects were provided with a low-calorie meal at lunch time 4 hours prior to blood sampling.

Lipid profile

Plasma lipid concentrations were measured by enzymatic methods on a Technicon RA-500 analyzer (Bayer Corp., Tarrytown, NY) as previously described (17). Plasma VLDL ($d < 1.006$ g/ml) was isolated by ultracentrifugation and the HDL fraction was obtained after precipitation of LDL in the infranatant ($d > 1.006$ g/ml) with heparin and $MnCl_2$. The cholesterol, TG, and phospholipid content of the infranatant fraction were measured before

and after the precipitation step. Total plasma apoA-I and apoB-100 concentrations were measured by nephelometry (18). ApoB-100 concentrations in VLDL, IDL and LDL fractions were measured at three different time points during the kinetic study by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (cardioCHEK, alerchek, Portland, ME). LDL peak particle diameter (PPD) was assessed by non denaturing 2–16% polyacrylamide gradient gel electrophoresis (19).

Lipoprotein isolation

ApoB-100 containing lipoprotein fractions at each time point of the 96-hr kinetic study were isolated from 5 ml of fresh plasma by sequential ultracentrifugation on KBr gradient in a Beckman 50.4 Ti rotor. A total of 5 ultracentrifuge runs were used for the isolation of VLDL ($d=1.006$ g/ml, 50 000 RPM, 8 hour), IDL ($d=1.019$ g/ml, 50 000 RPM, 18 hours), LDL-1, LDL-2 and LDL-3 (1.034, 1.044 and 1.063 g/ml respectively, 50 000 RPM, 22 hours).

ApoB-100 isolation

ApoB-100 of each lipoprotein fraction was isolated by SDS-PAGE, as previously described (20), with slight modifications. Briefly, 10 μ g apoB-100 were precipitated overnight in a cold mixture of acetone:methanol (1:1). Pellet was dissolved by heating sample in a buffer containing SDS and mercaptoethanol and loaded on 3-10% polyacrylamide gradient gels. Gels were stained for 1 hour in 0.25% Coomassie Blue R-250, and destained overnight.

ApoB-100 and plasma tracer enrichment measurements

Gel bands corresponding to apoB-100 were excised from gel and hydrolyzed with D-norleucine as internal control in 500 μ l HCL 6N control at 110°C for 24 hours. Plasma leucine was isolated by cation exchange chromatography on Dowex AG-50W-X8 resin using NH₄OH to elute the adsorbed amino acid. Amino acid mixtures from plasma and from hydrolyzed apoB-100 were lyophilized and converted to oxazolinone derivatives using trifluoroacetic acid and anhydrous trifluoroacetic acid (21). Derivatized amino acids were extracted into benzene and analyzed on a Hewlett-Packard 6890/5973 gas

chromatograph/mass spectrometer. Isotope enrichment (%) was calculated from the observed ion current ratios at m/z 209 (natural leucine) and 212 ($5,5,5\text{-}^2\text{H}$ -leucine). The isotopic enrichment of leucine in the apolipoproteins was expressed as tracer/(tracer+tracee) ratio (%) using standardized formulas after proper blank correction (22).

Multicompartmental modeling

ApoB-100 enrichment data with $5,5,5\text{-}^2\text{H}$ -leucine and apoB-100 masses of each lipoprotein subclass were fitted simultaneously by multi-compartmental modeling using the SAAM II software (SAAM Institute, Seattle, WA, USA). The compartmental model depicted in Figure 6.1, in which apoB-100 pools and fluxes are respectively represented by circles and arrows, is based on models currently used to describe apoB-100 intravascular kinetics (16, 23, 24) with addition of new subsystems that account for the specific kinetics of the three LDL subfractions. Enrichment data of the plasma leucine pool with deuterated leucine was used as the model's forcing function based on the assumption that the hepatic intracellular pool of leucine tRNA and the plasma pool of leucine are in close equilibrium throughout the kinetic study (24, 25). A two-compartment VLDL delipidation cascade model was used. ApoB-100 from VLDL was allowed to transfer to two IDL compartments, one representing a fast turning over pool of IDL apoB-100 transiting to LDL (compartment 9), the other representing a slow turning over pool of IDL (compartment 10). Since the raw enrichment curves reflected the presence of a precursor-product relationship between IDL and all LDL subclasses in most participants, as in (23), apoB-100 from IDL with a rapid turnover was allowed to transfer to LDL-1, LDL-2 or LDL-3 (compartments 11, 13 and 15 respectively). The disappearance of the tracer from the LDL-1 and LDL-2 pools was clearly bi-exponential, as reflected by the early rapid disappearance between 12 and 24 h, followed by a slower disappearance of the tracer in the later portion (after 24h) of the curves. Thus, LDL-1 and LDL-2 were best fitted using two-compartment sub-systems to mirror the presence of both a fast and a slowly turning over pool, similarly to IDL. ApoB-100 from rapidly turning over LDL-1 could transfer either to LDL-2 or LDL-3 while rapidly turning over LDL-2 transferred to LDL-3. LDL-3 data were fitted using two compartments between which LDL-3 could interchange, representing the ability of small LDL to

exchange with the extra vascular space. Adding an extra vascular compartment to the LDL-1 and LDL-2 portions of the model did not improve the fitting of enrichment data.

Specific fluxes, noted " $k(i,j)$ " for " $k(\text{to,from})$ ", were constrained to reduce the number of estimated parameters and to increase the precision of the model. Based on the assumption that the direct removal of VLDL and the transfer of apoB-100 between VLDL and IDL were driven by physiological mechanisms similar to those implicated in the delipidation cascade of VLDL, the sum of the fluxes out of compartment 7 was restrained to equal the flux between compartment 6 and compartment 7 [$k(9,7)+k(10,7)+k(0,7) = k(7,6)$]. The fluxes of apoB-100 from compartments 6 and 7 to the slowly turning over pool of VLDL (compartment 8) were set to equal each other [$k(8,6) = k(7,8)$]. The fluxes of apoB-100 out of compartments 10, 12 and 14, the slowly turning over pools of IDL, LDL-1 and LDL-2 respectively, were set to equal the input of apoB-100 into each of these compartments [$k(0,10) = k(10,7)$; $k(0,12) = k(12,9)$; $k(0,14) = k(14,11)$]. Finally, the fluxes between the intra and the extra-vascular compartments of LDL-3 were constrained to fix the extravascular mass of LDL-3 to 40% of the intravascular mass as in (25), because this mass could not be directly measured [$k(15,16) = 2.5 \cdot k(16,15)$]. Parameters that have been constrained are identified as dashed arrows in Figure 6.1. When slowly turning over pools for VLDL, IDL, LDL-1 or LDL-2, or when the extra-vascular LDL-3 compartment were unnecessary to achieve the best possible fit, corresponding transfer rates and compartment masses were fixed to zero.

The Akaike information criterion (AIC) and the Schwarz-Bayesian information criterion (BIC) were used to discriminate the model providing the best fit when models were being developed and compared. The SAAM II software provides a coefficient of variation (CV) for the estimated fluxes and constant rates. This CV was used to evaluate the confidence with which each kinetic parameter was estimated by the model. CV below 20% was judged acceptable but most CV were below 10%.

Calculation of apoB-100 kinetics

The fractional catabolic rate (FCR) of each apoB-100 containing subfraction, in pools/day, was calculated as the weighted mean FCR of all the compartments/pools specific to this

subfraction. The estimated mass of apoB-100 within each compartment was used as the weighting value. ApoB-100 pool size (PS) in each fraction was calculated as follows: ApoB-100 concentration (mg/dl) x plasma volume (0.45 dl/kg body weight) (26, 27). ApoB-100 production rate (PR; mg/kg body weight/day) was computed using the formula:

$$PR = (\text{fractional catabolic rate (pools/d)} \times \text{PS (mg/pool)}) / \text{body weight (kg)}.$$

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using the SAS software (v8.02, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Correlation analyses were performed using the Spearman rank calculation. Differences in the kinetics of the three different LDL subclasses were compared using generalized linear modeling and the Tukey honestly-significant-difference for multiple comparisons.

Results

Study subjects

Participant characteristics as summarized in Table 6.1. As a group, study participants displayed a healthy plasma lipid profile with concentrations of total cholesterol (total-C), LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-cholesterol (HDL-C) and triglyceride (TG) all within the normal range according to the NCEP-ATP III criteria (28). Nine out of the 12 participants had a body mass index (BMI) greater than 25 kg/m² (range: 25.01-29.74).

LDL subclasses and LDL size

The mean LDL PPD was gradually and significantly reduced as the density of each LDL fraction increased ($P < 0.0001$ for trend, Table 6.2). This relationship was seen in almost all study subjects, with only two participants having LDL-2 particles that were smaller in size than their LDL-3 (data not shown). The distribution of LDL-PPD among LDL density subclasses was generally well resolved ("polydisperse") with the exception of a few participants in whom there was considerable overlap in the size of LDL in the various LDL density subclasses (not shown). Individuals with "polydisperse" LDL ($N=7$) showed significantly higher plasma TG levels (1.49 ± 0.52 vs 0.77 ± 0.33 mmol/l, $P=0.02$), higher VLDL apoB-100 pool size (322.3 ± 150.9 vs 150.5 ± 71.5 mg, $P=0.04$), higher total-to-HDL-cholesterol ratio (4.26 ± 0.69 vs 3.72 ± 0.70 , $P=0.02$) and significantly smaller LDL-3 PPD (252.4 ± 1.1 vs 255.5 ± 2.0 Å, $P=0.005$) than subjects with "monodisperse" LDL (more overlap in LDL size between the three LDL subfractions).

LDL kinetics and LDL subclasses

The measured and model-predicted mean LDL-1, LDL-2 and LDL-3 enrichment data from the 12 study participants is illustrated in Figure 6.2. Multi-compartmental modeling revealed that IDL was an important precursor of both LDL-1 and LDL-2, contributing to respectively 95% and 40% of the apoB-100 input in these subclasses (Table 6.3). In turn, LDL-1 and LDL-2 were the main LDL-3 precursors, with LDL-1 providing significantly more direct input of apoB-100 into LDL-3 than LDL-2 ($P=0.03$). A significant proportion of the apoB-100 input into LDL-1, LDL-2 and LDL-3 came as direct secretion from the

liver, of which approximately 70% ($\pm 16\%$) was secreted specifically as LDL-3, on average (Table 6.3). The direct removal of apoB-100 from the circulation seemed more important for LDL-2 than for LDL-1, but the difference did not reach statistical significance ($P=0.14$) because of very large inter-individual variations.

Among LDL subclasses, lower apoB-100 FCRs were observed as the density of the LDL increased ($P=0.0001$ for trend, Table 6.2), although the 5-fold greater FCR of LDL-3 compared with LDL-2 did not reach statistical significance. A positive association was also observed between the size and the FCR of LDL in pooled data analysis (Figure 6.3). This relationship, however, was not observed within individual LDL subclasses (LDL-1: $r=-0.20$, $P=0.53$; LDL-2: $r=-0.10$, $P=0.80$; LDL-3: $r=-0.02$, $P=0.94$, data not shown). Within LDL-3, the apoB-100 pool size was strongly associated with the LDL-3 apoB-100 production rate ($r=0.89$, $P<0.0001$, data not shown). In contrast, neither the PR nor the FCR of apoB-100 were so clearly associated with the apoB-100 pool size in LDL-1 and LDL-2 (data not shown).

The FCR values of each LDL subclass did not correlate among themselves. On the other hand, the FCR of LDL-1 was positively correlated with the FCR of VLDL ($r=0.80$, $P=0.002$) and IDL ($r=0.59$, $P=0.04$) and negatively associated with the pool size of VLDL apoB-100 ($r=-0.80$, $P=0.002$) and with plasma TG concentrations (-0.76 , $P=0.004$). The FCR of LDL-2 was only negatively correlated with the VLDL apoB-100 pool size ($r=-0.57$, $P=0.05$). No significant association was found between the FCR of LDL-3 and any of these apoB-related kinetic parameters. The apoB-100 pool size of LDL-1 and LDL-2 were positively correlated with plasma TG concentrations while the pool size of LDL-2 and LDL-3 were positively associated with plasma cholesterol concentrations (not shown). The production rate of apoB-100 in all LDL subclasses was positively correlated with plasma cholesterol concentrations (LDL-1: $r=0.57$, $P=0.055$; LDL-2: $r=0.68$, $P=0.015$; LDL-3: $r=0.78$, $P=0.003$). Although subjects with non-overlapping LDL diameter distributions tended to display slower catabolism of VLDL (15.9 vs 24.1 pools/d, $P=0.13$), LDL-1 (6.5 vs 9.4 pools/d, $P=0.19$) and LDL-2 (1.7 vs 3.2 pools/d, $P=0.04$) compared with subjects in whom the size of the three LDL subclasses showed a greater degree of overlap, no

significant differences were observed between individuals with polydisperse or monodisperse LDL in terms of apoB-100 kinetics.

Discussion

The aim of the present study was to investigate the association between LDL size and the kinetics of LDL apoB-100 in humans. Using endogenous labelling with deuterated leucine in 12 healthy men, the kinetics of apoB-100 and the particle size were determined in three different LDL density subclasses obtained by sequential ultracentrifugation. To the best of our knowledge, this is the first study to directly investigate the inter-relationship between LDL size and LDL kinetics.

LDL subclasses characterization

By design, the mean LDL PPD was significantly reduced as the density of LDL increased. In 7 out of 12 subjects, the distribution of LDL sizes between LDL density subclasses was well resolved. In others, however, the electrophoretic patterns of the different LDL subclasses were considerably overlapping, meaning that LDL of a given size could be found in almost all density subclasses. This heterogeneity in LDL distribution is consistent with the previous observation from Fisher *et al.* that individuals could be categorized based on their "monodisperse" or "polydisperse" LDL profile, the "polydisperse" profile being more consistently observed in hypertriglyceridemic individuals (29). In our study, subjects with monodisperse LDL displayed a more homogeneous plasma LDL size spectrum. Consistent with data from Fisher *et al.*, subjects with polydisperse LDL were characterized by a less favorable metabolic profile with higher plasma TG concentrations, VLDL apoB-100 pool size, total-to-HDL-cholesterol ratio and significantly smaller LDL-3 particle size.

ApoB-100 model

Our multi-compartmental model is structurally comparable to previously published apoB-100 models (16, 23, 24) and provided an excellent fit of both apoB-100 enrichment and mass data of all studied lipoprotein fractions. VLDL was modeled using a shorter, two-compartment delipidation cascade instead of the mostly used four-compartment delipidation cascade. Several reasons supported this adaptation, the main one being that the four-compartment VLDL delipidation cascade constantly yielded higher-than-normal VLDL FCR values (31.84 ± 14.13 vs. 19.34 ± 9.11 pools/d for the 5 vs. 3-subcompartment

models respectively, $P=0.017$ for comparison), without significantly improving the fitting of VLDL data based. The FCR generated for VLDL (19.34 ± 9.10) and IDL (14.90 ± 9.87) using this model were slightly more elevated than previously published values (30, 31). That is most likely attributable to the good "metabolic fitness" of our study subjects. FCR values generated for LDL-3, which accounted for 85% of total LDL, were also concordant with data from (30, 31).

LDL kinetics and effect of LDL size

In concordance with the few other studies in humans that have investigated the turnover of different LDL subclasses, the denser LDL-2 and LDL-3 subclasses exhibited a significantly reduced FCR compared to the more buoyant LDL-1 subclass. Reduced LDL-PPD also predicted a slower FCR of the particle when all LDL subclasses were included in the analysis. On the other hand, this relationship was not observed within individual LDL subclasses. This could be due to the small sample size or to the relative homogeneity in LDL size within each subclass. The size of LDL may alter LDL clearance in part by affecting its affinity for the hepatic LDL-receptor (5, 7). LDL-1 and LDL-2, according to our multi-compartmental analysis, were preferentially converted into LDL-3 rather than removed from the circulation, as also observed by Fisher et al (9). Thus, rather than providing evidence for a causal role of particle size in modulating the clearance rate of LDL, our data suggest that most buoyant LDL are rapidly processed to generate denser LDL particles. Our data, however, do not rule out the possibility that further remodeling could occur within the predominant LDL-3 subclass, generating smaller and denser LDL that have a proportionally reduced turn over. Although the skewed distribution of apoB-100 towards LDL-3 may limit the interpretation of our results, this characteristic of our study has also helped unravel the concept that LDL-1 and LDL-2 may represent a significant proportion of LDL that most likely have to be properly remodeled into smaller and denser particles prior to their definitive removal from circulation.

Metabolic associations within LDL subclasses

The well documented negative association between plasma TG concentrations and LDL size (1, 2, 32) was observed only within the LDL-3 subclass in the present study. In

contrast, plasma TG concentrations were positively associated with the PPD of LDL-1 while they showed no association with the PPD of LDL-2. This is consistent with the correlation observed between LDL-1 FCR and plasma TG concentrations as well as the FCR and pool size of VLDL and of IDL. On the other hand, there was only a weak association between the PR of LDL-1 and plasma cholesterol concentrations. LDL-2 kinetics showed only modest associations with TG-rich lipoprotein kinetics, despite the fact that positive associations were observed between LDL-2 pool size and both plasma TG and cholesterol concentrations. Regarding LDL-3 kinetics, the only significant metabolic association was found between the PR of LDL-3 and plasma cholesterol concentrations (data not shown).

Proposed model of LDL metabolism and sdLDL formation in metabolically fit individuals

Altogether, our results strongly support the concept of significant LDL heterogeneity in terms of particle size, particle density and intravascular metabolism. Our findings also indicate that this assertion remains true even in metabolically fit individuals. Our data showed that large LDL, such as LDL-1 and LDL-2, are key precursors of denser LDL rather than end-products readily removable from circulation, as previously observed by Fisher *et al.* in both hypertriglyceridemic and familial hypercholesterolemic individuals (8, 9). The significant association between LDL-1 and TG-rich lipoprotein kinetics observed in the present study, combined with data from Vega *et al.* showing that the triglyceride content was the most notable difference between "light" and "heavy" LDL (14) strongly suggest that buoyant LDL are processed either via the same metabolic pathways responsible for the processing of TG-rich lipoproteins or via pathways similarly regulated. This would also be consistent with findings from Teng *et al.* showing that heparin injection, known to increase plasma lipase activities, accelerates the clearance of "light" LDL without significantly altering the clearance of "heavy" LDL (11). The required conversion of buoyant LDL into denser LDL prior to their definitive removal was also proposed by Vega & Grundy to explain the faster decay of plasma specific activity of re-injected I¹³¹-labeled "heavy" LDL compared to I¹²⁵-labeled "light" LDL (14).

Plasma TG concentrations are thought to be a key factor in small dense LDL formation. In hypertriglyceridemic states, LDL are enriched with TG through the action of the cholesterol ester transfer protein (CETP), which mediates the exchange of cholesterol ester for TG between LDL (and HDL) and TG-rich lipoproteins. These TG-enriched particles are then more susceptible to hydrolysis by the hepatic lipase and perhaps also endothelial lipase, resulting in a net reduction in their size. The extended delipidation of large, TG-rich VLDL (termed "larger VLDL-1") is also currently thought to directly generate small dense LDL (33). The contribution of these factors and processes as key modulators of the strong relationship observed between plasma TG concentrations and the PPD of LDL-3 was not specifically assessed in the present study. However, our data are consistent with these proposed models of small dense LDL formation by having highlighted further specific association between the plasma TG and LDL subclass size and kinetics, even in metabolically fit individuals. On the other hand, the present study provides no evidence of a causal role of LDL particle size in modulating neither the remodeling of large LDL into denser LDL or the removal of LDL from circulation in healthy individuals.

Conclusions

This study has emphasized for the first time using stable isotopes the significant heterogeneity in the kinetics of LDL with different sizes and density, while supporting current concepts of lipoprotein metabolism. Additional studies in metabolically unfit subjects and in women will be of great interest in the future to further understand how large and small dense LDL are interrelated and processed.

Acknowledgements

Authors would like to thank the subjects who kindly took part in the present study. Authors are also deeply indebted to Amélie Charest, Danielle Aubin, Georges Cousineau and Johanne Marin for their most valuable help in conducting the present study. Jean-François Mauger and Benoît Lamarche are also thankful to Dr Hugh Barrett for his helpful advice concerning the modeling of kinetic data. Jean-François Mauger is a recipient of a Studentship from the Canadian Institutes of Health Research. Benoît Lamarche is a Canada Research Chair in Nutrition and Cardiovascular Health. Patrick Couture is a Research Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

1. Rizzo M, Berneis K. Should we measure routinely the LDL peak particle size? *Int J Cardiol.* 2006;107:166-170.
2. Lamarche B, Lemieux I, Després JP. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab.* 1999;25:199-211.
3. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Després JP, Lamarche B. Comparison of Various Electrophoretic Characteristics of LDL Particles and Their Relationship to the Risk of Ischemic Heart Disease. *Circulation.* 2001;104:2295-2299.
4. Galeano NF, Al Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J.Lipid Res.* 1998;39:1263-1273.
5. Toyota Y, Yamamura T, Miyake Y, Yamamoto A. Low density lipoprotein (LDL) binding affinity for the LDL receptor in hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1999;147:77-86.
6. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3542-3556.
7. Berneis K, Shames DM, Blanche PJ, La Belle M, Rizzo M, Krauss RM. Plasma clearance of human low-density lipoprotein in human apolipoprotein B transgenic mice is related to particle diameter. *Metabolism.* 2004;53:483-487.
8. Fisher WR, Zech LA, Kilgore LL, Stacpoole PW. Metabolic pathways of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia: studies with a [3H]leucine tracer. *J Lipid Res.* 1991;32:1823-1836.

9. Fisher WR, Zech LA, Bardalaye P, Warmke G, Berman M. The metabolism of apolipoprotein B in subjects with hypertriglyceridemia and polydisperse LDL. *J Lipid Res.* 1980;21:760-774.
10. Marzetta CA, Foster DM, Brunzell JD. Conversion of plasma VLDL and IDL precursors into various LDL subpopulations using density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 1990;31:975-984.
11. Teng B, Sniderman AD, Soutar AK, Thompson GR. Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apolipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1986;77:663-672.
12. Campos H, McNamara JR, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ. Differences in low density lipoprotein subfractions and apolipoproteins in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:30-35.
13. Campos H, Walsh BW, Judge H, Sacks FM. Effect of estrogen on very low density lipoprotein and low density lipoprotein subclass metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3955-3963.
14. Vega GL, Grundy SM. Kinetic heterogeneity of low density lipoproteins in primary hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis.* 1986;6:395-406.
15. Yamane K, Kataoka S, Le NA, Paidi M, Howard WJ, Hannah JS, Howard BV. Binding affinity and particle size of LDL in subjects with moderate hypercholesterolemia: relationship with in vivo LDL metabolism. *J Lipid Res.* 1996;37:1646-1654.
16. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ, Schwertfeger G, Bedynek A, Shepherd J, Seidel D. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res.* 2000;41:305-318.
17. Archer WR, Lamarche B, Deriaz O, Landry N, Corneau L, Despres JP, Bergeron J, Couture P, Bergeron N. Variations in body composition and plasma lipids in response to a high-carbohydrate diet. *Obes.Res.* 2003;11:978-986.

18. An P, Rice T, Gagnon J, Borecki IB, Bergeron J, Despres JP, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C, Rao DC. Segregation analysis of apolipoproteins A-1 and B-100 measured before and after an exercise training program: the HERITAGE Family Study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:807-814.
19. Mauger JF, Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Jauhiainen M, Ehnholm C, Lamarche B. Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. *Am.J.Clin.Nutr.* 2003;78:370-375.
20. Ruel IL, Lamarche B, Mauger JF, Badellino KO, Cohn JS, Marcil M, Couture P. Effect of fenofibrate on plasma lipoprotein composition and kinetics in patients with complete hepatic lipase deficiency. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005;25:2600-2607.
21. Dwyer KP, Barrett PH, Chan D, Foo JI, Watts GF, Croft KD. Oxazolinone derivative of leucine for GC-MS: a sensitive and robust method for stable isotope kinetic studies of lipoproteins. *J.Lipid Res.* 2002;43:344-349.
22. Ramakrishnan R. Studying apolipoprotein turnover with stable isotope tracers: correct analysis is by modeling enrichments. *J.Lipid Res.* 2006;47:2738-2753.
23. Geiss HC, Bremer S, Barrett PH, Otto C, Parhofer KG. In vivo metabolism of LDL subfractions in patients with heterozygous FH on statin therapy: rebound analysis of LDL subfractions after LDL apheresis. *J Lipid Res.* 2004;45:1459-1467.
24. Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res.* 2006;47:1607-1619.
25. Demant T, Packard CJ, Demmelmair H, Stewart P, Bedynek A, Bedford D, Seidel D, Shepherd J. Sensitive methods to study human apolipoprotein B metabolism using stable isotope-labeled amino acids. *Am J Physiol.* 1996;270:E1022-1036.
26. Cohn JS, Wagner DA, Cohn SD, Millar JS, Schaefer EJ. Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (Apo) B-100 and high density

lipoprotein Apo A-I production in human subjects using deuterated leucine. Effect of fasting and feeding. *J Clin Invest.* 1990;85:804-811.

27. Kalra PR, Anagnostopoulos C, Bolger AP, Coats AJ, Anker SD. The regulation and measurement of plasma volume in heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2002;39:1901-1908.

28. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama.* 2001;285:2486-2497.

29. Hammond MG, Mengel MC, Warmke GL, Fisher WR. Macromolecular dispersion of human plasma low-density lipoproteins in hyperlipoproteinemia. *Metabolism.* 1977;26:1231-1242.

30. Parhofer KG, Barrett PH. Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res.* 2006;47:1620-1630.

31. Marsh JB, Welty FK, Lichtenstein AH, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Apolipoprotein B metabolism in humans: studies with stable isotope-labeled amino acid precursors. *Atherosclerosis.* 2002;162:227-244.

32. Millar JS, Packard CJ. Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:197-202.

33. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J.Lipid Res.* 2002;43:1363-1379.

Figure legends:**Figure 6.1:**

Schematic representation of the multicompartmental model used in the present study. Please see Model development in Methods for details

Figure 6.2:

Measured and model-predicted apoB-100 enrichment data overtime obtained for the three LDL subclasses. Each point represents the mean enrichment of apoB-100 with 5,5,5-²D₃-L-leucine for the 12 study subjects I(± SEM). For LDL-1 and LDL-2, the dotted lines represent the model-predicted tracer enrichment in the slowly turning over pool while dashed lines represent the model-predicted tracer enrichment in the rapidly turning over pool. The continuous lines represent the sum of the two pools.

Figure 6.3:

Pooled data analysis of the relationship between LDL particle diameter and the FCR of apoB-100 in all LDL fractions combined.

Figure 6.1

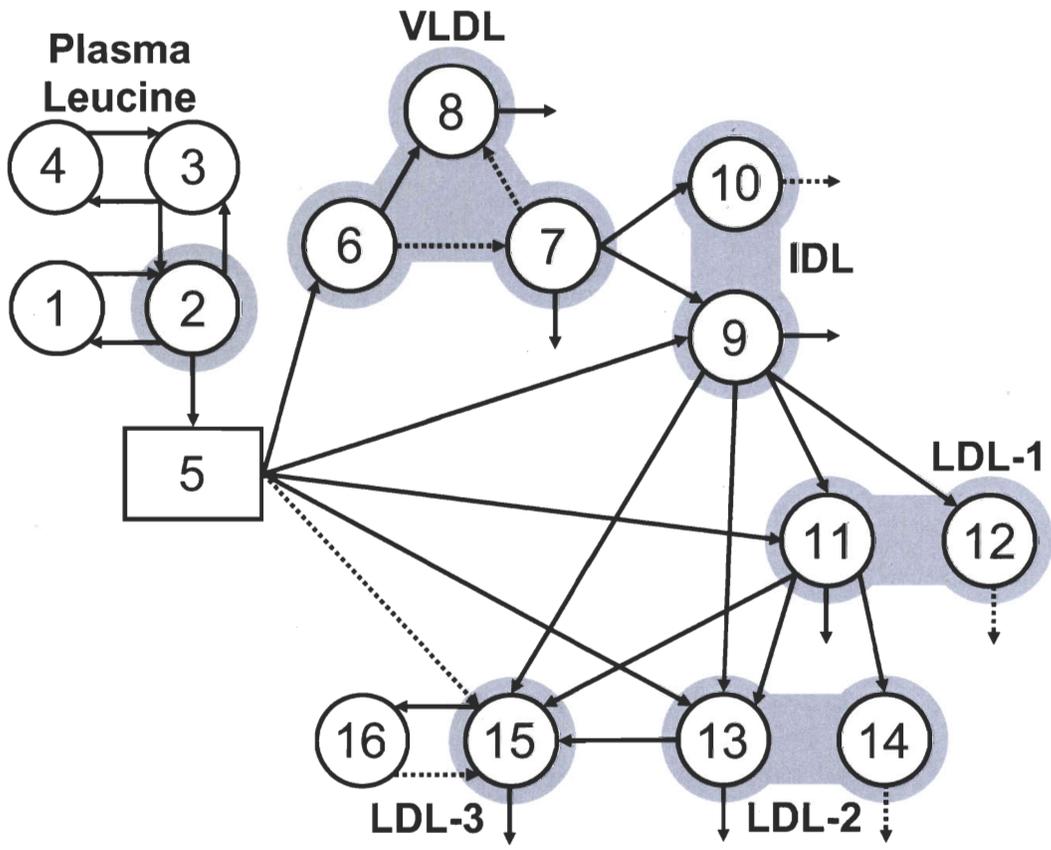


Figure 6.2

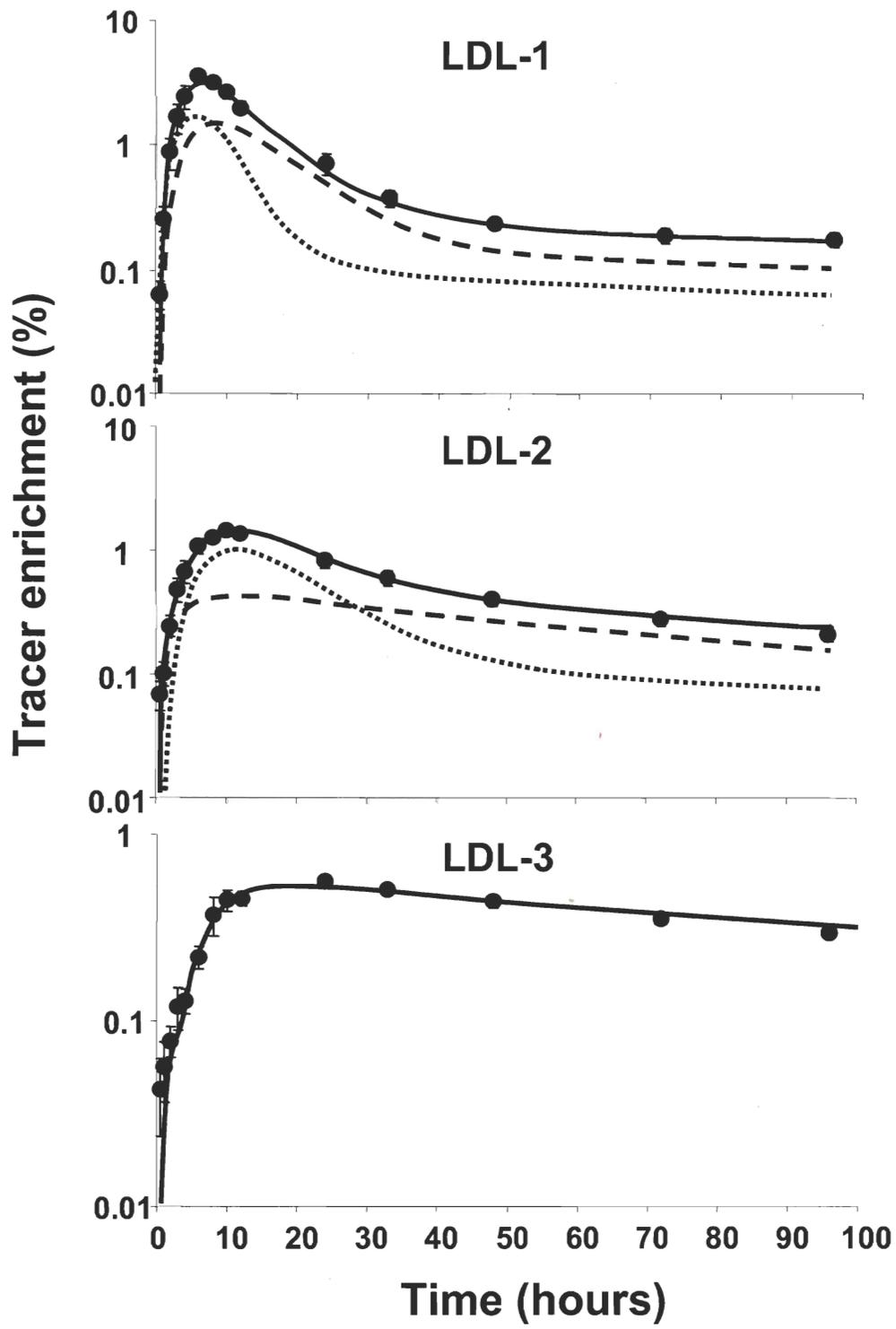


Figure 6.3

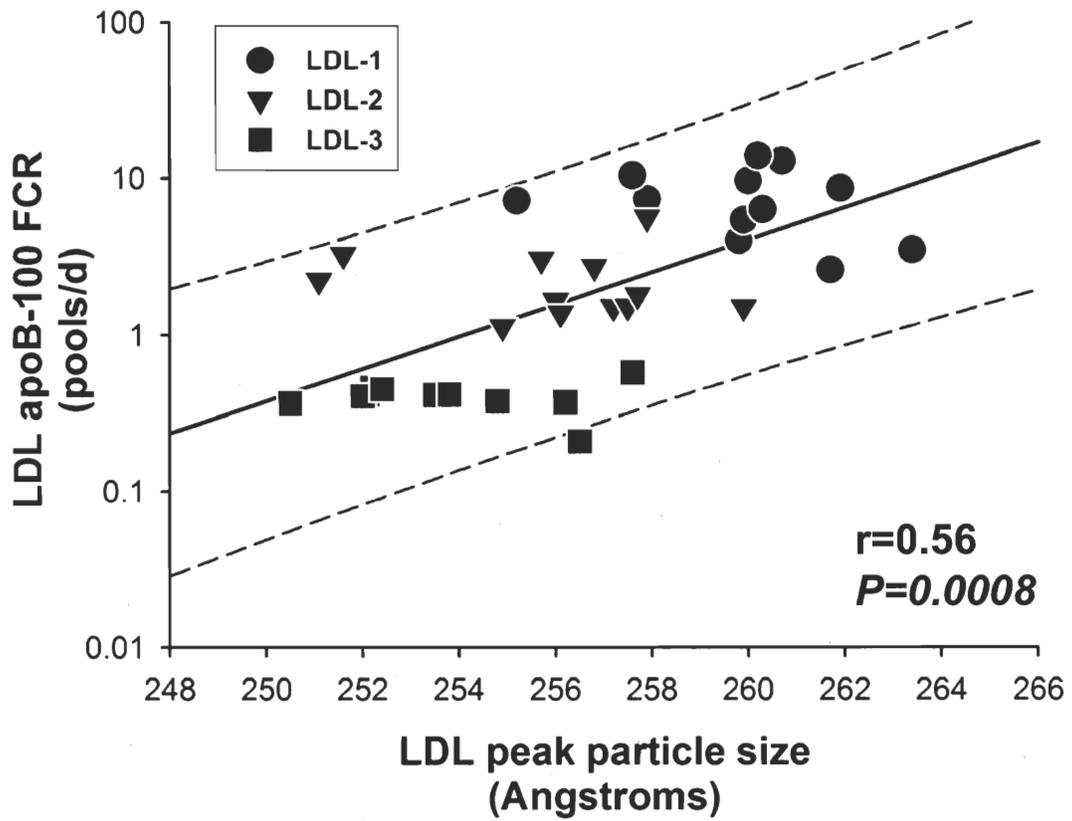


Table 6.1: Characteristics of the 12 study participants

Variable	Mean \pm SD
Age (y)	37.3 \pm 13.2
Weight (kg)	82.7 \pm 11.5
BMI (kg/m ²)	25.8 \pm 2.6
Waist girth (cm)	89.2 \pm 9.5
Triglyceride (mmol/l)	1.19 \pm 0.57
Total-C (mmol/l)	4.30 \pm 0.91
HDL-C (mmol/l)	1.16 \pm 0.23
LDL-C (mmol/l)	2.59 \pm 0.77
ApoA-I (g/l)	1.37 \pm 0.15
Total ApoB-100 (g/l)	0.80 \pm 0.20
Fasting glucose (mmol/l)	5.2 \pm 0.5

BMI: body mass index, C: Cholesterol,

apo: apolipoprotein

TABLE 6.2 : LDL characteristics and apoB-100 kinetics within the 5 lipoprotein fractions in the sample of 12 men.

	VLDL	IDL	LDL-1	LDL-2	LDL-3
Peak particle diameter (Å)	-	-	259.9 ± 2.2 ^a	256.0 ± 2.5 ^b	253.7 ± 2.2 ^c
Relative proportion* (% of total apoB)	10.7 ± 4.9	1.2 ± 0.5	3.7 ± 1.3 ^a	5.2 ± 1.7 ^a	79.1 ± 5.7 ^b
Concentration (mg/dl)	6.64 ± 3.78	0.80 ± 0.62	2.34 ± 1.30 ^a	3.17 ± 1.48 ^a	50.26 ± 20.73 ^b
Pool size (mg)	251.3 ± 155.5	30.9 ± 28.4	88.5 ± 56.0 ^a	117.5 ± 57.3 ^a	1876 ± 910 ^b
FCR (pools/day)	19.3 ± 9.1	14.9 ± 9.9	7.71 ± 3.62 ^a	2.30 ± 1.26 ^b	0.41 ± 0.09 ^b
PR (mg/kg/day)	49.0 ± 16.7	4.4 ± 1.8	7.2 ± 3.6 ^a	3.0 ± 1.3 ^b	9.3 ± 3.9 ^a

* Calculated as the proportion of apoB-100 relative to total LDL-apoB-100 concentration. ApoB-100 levels and LDL-peak particle diameter in each LDL fraction were averaged from three measurements made at different time points during the kinetic study for each participant. The mean ± SD for the 12 participants is presented. Only values between the three LDL subclasses were compared statistically. Values sharing common superscript within the same row are not significantly different (Tukey Honest-significant-difference Test for multiple comparisons). FCR : Fractional catabolic rate, PR : Production rate.

Table 6.3: Absolute and relative apoB-100 fluxes within the three LDL subfractions

	ApoB-100 flux (mg/d)	% apoB-100
LDL-1		
<i>Input</i>		
<i>Direct from liver</i>	25.7 ± 23.0	4.2 ± 3.6
<i>from IDL</i>	574.3 ± 269.0	95.8 ± 3.6
<i>Output</i>		
<i>Direct clearance</i>	65.4 ± 164.8	6.6 ± 15.5
<i>To LDL-2</i>	140.6 ± 144.1	23.6 ± 24.5
<i>To LDL-3</i>	394.0 ± 195.4	69.8 ± 28.1
LDL-2		
<i>Input</i>		
<i>Direct from liver</i>	16.8 ± 14.8	7.4 ± 5.9
<i>from IDL</i>	68.3 ± 79.1	40.1 ± 41.8
<i>from LDL-1</i>	140.6 ± 144.1	52.5 ± 42.8
<i>Output</i>		
<i>Direct clearance</i>	36.9 ± 62.5	26.3 ± 44.5
<i>To LDL-3</i>	188.7 ± 140.8	73.7 ± 44.5
LDL-3		
<i>Input</i>		
<i>Direct from liver</i>	109.5 ± 108.0	12.6 ± 5.7
<i>from IDL</i>	82.2 ± 193.5	7.2 ± 13.7
<i>from LDL-1</i>	394.0 ± 195.4	55.4 ± 25.4
<i>from LDL-2</i>	188.7 ± 140.8	24.8 ± 21.5
<i>Output</i>		
<i>Direct clearance</i>	774.4 ± 393.4	100

“Direct clearance” reflects apoB-100 that is irreversibly removed from circulation, i.e. not transferred to other lipoprotein fractions. “Output” refers to the apoB-100 leaving an LDL subclass, whether it is cleared or transferred to other lipoprotein subclasses

Chapitre 7. Cinétique intravasculaire de la protéine C-réactive chez l'humain en lien avec les facteurs de risque du syndrome métabolique

Jean-François Mauger, Josée Lévesque, Marie-Eve Paradis, Nathalie Bergeron, André Tchernof, Patrick Couture, Benoît Lamarche

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2008 Aug; 93(8):3158-64

Résumé

L'objectif de l'étude qui constitue ce chapitre était de décrire, par infusion constante de $^2\text{H}_3$ -leucine, la cinétique intravasculaire de la CRP in vivo chez l'homme et la femme. Le FCR de la CRP était 60% plus élevé chez les hommes que chez les femmes (0.49 ± 1.83 vs. 0.30 ± 1.80 pool/j, $P=0.03$) mais cette différence était atténuée lorsque les facteurs de risque du syndrome métabolique étaient considérés lors de l'analyse statistique multivariée. Les concentrations plasmatiques de CRP étaient plus fortement corrélées au PR ($r=0.80$, $P<0.0001$) qu'au FCR de la CRP ($r=0.39$, $P<0.05$). Le PR de la CRP, ajusté pour le sexe, était positivement associé au tour de taille ($r=0.53$, $P<0.01$) et aux concentrations plasmatiques de LDL-apoB-100 ($r=0.42$, $P=0.07$), de triglycérides ($r=0.41$, $P=0.06$) et d'IL-6 ($r=0.61$, $P=0.0008$) et inversement associé aux concentrations plasmatique de HDL-C ($r=-0.47$, $P=0.03$) et d'adiponectine ($r=-0.63$, $P<0.0005$). Ces résultats suggèrent que le PR de la CRP constitue le déterminant principal des concentrations plasmatiques de CRP et que celui-ci serait influencé par les facteurs de risque du syndrome métabolique et les concentrations plasmatiques d'adiponectine et d'IL-6.

Intravascular kinetics of C-reactive protein and their relationships with features of the metabolic syndrome

Short title: CRP kinetic and features of the metabolic syndrome

Jean-François Mauger¹, Josée Lévesque¹, Marie-Eve Paradis¹, Nathalie Bergeron², André Tchernof³, Patrick Couture⁴, Benoît Lamarche¹.

From 1- Institute on Nutraceuticals and Functional Foods, Laval University, Quebec, Canada, 2- College of Pharmacy, Touro University-California, Vallejo, CA, 3- Molecular Endocrinology and Oncology Research Center, Laval University Medical Research Center, and 4- Lipid Research Clinic, Laval University Medical Research Center, Quebec, Canada.

Address of correspondence:

Benoît Lamarche, PhD.

Institute on Nutraceuticals and Functional Foods

Pavillon des services, Laval University, Québec

2440 Hochelaga Blvd

Québec, Canada, G1K 7P4

Tel.: (418) 656-3527

Fax: (418) 656-5877

E-mail: Benoit.Lamarche@inaf.ulaval.ca

KEYWORDS: Inflammation, C-reactive protein, kinetics, metabolic syndrome, adiponectin

Abstract

OBJECTIVE To describe, for the first time, the intravascular kinetics of C-reactive protein (CRP), using stable isotopes, and its relationship with features of the metabolic syndrome.

METHODS Sixteen men and 16 women [aged 49 ± 9 years, body mass index (BMI) 28.7 ± 4.5 kg/m²] underwent a 12-hour primed-constant infusion of 5,5,5-²H₃-L-leucine. CRP was purified from the plasma fraction $\rho > 1.25$ g/ml by affinity chromatography and isotopic enrichment over time was determined by GC-MS.

RESULTS CRP fractional catabolic rate (FCR) was 60% higher in men than in women (0.49 ± 1.83 vs. 0.30 ± 1.80 pool/day, $P=0.03$) but this difference was no longer significant in a multivariate model that included several features associated with the metabolic syndrome. CRP production rate (PR) and pool size (PS) were not statistically different between sexes. Plasma CRP concentrations were more strongly correlated with the PR ($r=0.80$, $P<0.0001$) than with the FCR of CRP ($r=0.39$, $P<0.05$). The PR of CRP was positively correlated with waist girth ($r=0.53$, $P<0.01$), plasma LDL apoB-100 ($r=0.42$, $P=0.07$), triglyceride ($r=0.41$, $P=0.06$) and interleukin-6 (IL-6) concentrations ($r=0.61$, $P=0.0008$) and inversely correlated with HDL-cholesterol (C) ($r=-0.47$, $P=0.03$) and adiponectin ($r=-0.63$, $P<0.0005$) after adjustment for sex. Blood pressure and LDL-C showed no association with CRP kinetics.

CONCLUSION The PR of CRP appeared as the main determinant of CRP concentrations and showed significant associations with features of the metabolic syndrome as well as with adipose tissue-derived cytokines such as IL-6 and adiponectin.

Introduction

C-reactive protein (CRP) has been used extensively as a non-specific marker of acute phase response in humans for decades (1). Inflammation is being increasingly suggested to play a determinant role in the initiation and development of atherosclerosis, the hallmark of cardiovascular disease (CVD) in industrial countries (2). The predictive value of plasma CRP concentrations measured by a high sensitivity assay as a risk factor for CVD has been investigated in several epidemiological studies. These studies have been relatively consistent in showing that individuals with high baseline CRP levels (>3.0 mg/l) were at greater risk of CVD compared to individuals with lower (<1.0 mg/l) CRP levels, independent of sex (3,4,5,6). However, recent studies have produced less conclusive data on the added value of CRP to predict CVD risk compared to traditional risk factors such as LDL-cholesterol (LDL-C) (7,8).

The metabolic syndrome (MetSyn) is another emerging paradigm in the management of CVD risk and latest estimates showed that individuals affected by the MetSyn have a 3-fold increased risk of CVD (9). The most recent definition of MetSyn by the International Diabetes Federation includes elevated waist girth (various cut-points depending on ethnicity and gender) plus any two of the following: elevated plasma triglyceride (>1.7 mmol/l), low HDL-C (>1.03 mmol/l for men, >1.29 mmol/l for women), high blood pressure ($>130/85$ mmHg) and high fasting plasma glucose (>5.6 mmol/l) (10). Interestingly, most patients with MetSyn also display low-grade chronic inflammation, as reflected by elevated plasma CRP concentrations (11,12,13,14,15). This relationship may be explained, at least partly, by concurrent variations in a novel adipose tissue exclusive endocrine factor named adiponectin. Early reports on adiponectin showed its strong insulin sensitizing and anti-inflammatory effects. Consistent with these observations, reduced plasma adiponectin concentrations have been repeatedly correlated with several of the MetSyn features, including increased plasma CRP concentrations (16).

While novel endocrine factors responsible for the association between inflammation and the MetSyn are beginning to be identified, the physiological mechanisms sustaining plasma CRP concentrations in this metabolic condition are still virtually unknown. Kinetic studies of proteins using stably-labelled isotopomer precursors provide considerable precision

about *in vivo* protein synthesis rates and have become the gold standard to investigate such mechanisms in humans. *In vivo* CRP kinetics have never been studied using endogenous-labelling methods. Furthermore, data on the relationship between CRP kinetics in human and traditional and emerging CVD risk factors associated with the MetSyn are utterly lacking.

The aim of the present study was therefore to investigate, for the first time, the intravascular kinetics of CRP using endogenous protein labelling with stable isotopes in men and women with CRP levels corresponding to different strata of CVD risk according to current guidelines. We also sought to examine the association between features of the MetSyn and the *in vivo* kinetics of CRP in men and women.

Methods

Study subjects

Sixteen Caucasian men and 16 Caucasian women, nonsmoker, normoglycemic and free of any thyroid, endocrine, cardiovascular, hepatic, or renal disorders were recruited in the Québec City area. Subjects who experienced significant gain or loss of weight (> 3 kg) in the 2 months preceding the study, who had excessive alcohol intake (> 30 g/d), had taken drugs, or had unusual dietary habits were excluded. CRP kinetics could not be determined in one male subject due to extremely low plasma CRP concentrations. Thus, final analyses are based on a sample size of 15 male and 16 female subjects. Women who were postmenopausal (11 out of 15) were not taking hormone replacement therapy. All subjects gave written informed consent to participate and the study protocol was accepted by the Clinical Research Ethical Committee of Laval University. The most recent definition from the International Diabetes Federation was used to identify men and women with the MetSyn (10). However, the waist girth cut-off values suggested by the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (men: >102 cm; women: >88 cm) were used as proposed by the International Diabetes Federation in a recent publication because they have been the reference values used in most studies conducted in North American Caucasians subjects (10).

Anthropometric measurements

Body weight and waist circumferences were measured according to standardized procedures (17).

Lipid and plasma protein measurements

Plasma VLDL ($\rho < 1.006$ g/ml) were isolated by ultracentrifugation and the HDL fraction was obtained after precipitation of LDL in the infranatant ($\rho > 1.006$ g/ml) with heparin and MnCl_2 . The cholesterol, TG, and phospholipid concentrations in the various plasma fractions were measured by enzymatic methods on a Technicon RA-500 analyzer (Bayer Corp., Tarrytown, NY) as previously described (18). Plasma apoA-I and VLDL-apoB-100 concentrations were measured by nephelometry (19). LDL cholesterol concentrations were

estimated using the Friedwald equation (20) while LDL apoB-100 levels were obtained by subtraction. Commercial high sensitivity immunosorbent assays were used to measure plasma IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) and CRP concentrations (BioCheck Inc, Foster City, CA). Adiponectin was measured using a commercial radio-immunoassay (Linco Research Inc., St Charles, MO, USA) (21).

Kinetic studies

At 7h00, after a 12-hour fast, study participants were admitted at the clinical investigation unit. They immediately started consuming half-hourly small snacks that each accounted for 1/30 of their estimated daily caloric intake, to achieve a constantly fed steady state (22). After three hours of constant feeding, the primed-constant infusion of [5, 5, 5,⁻²H₃]-L-leucine was initiated and carried out for 12 hours, with participants kept in the constantly fed steady state. The bolus dose and injection rate of [5, 5, 5,⁻²H₃]-L-leucine were calculated based on the subjects' weight (10 μmol/kg and 10 μmol/kg/h respectively). Blood samples (20 ml) were collected via a second intravenous line into vacutainer tubes containing EDTA (to a final concentration of 0.1%) at time 0.0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 hours.

CRP isolation

The density of plasma (2.0 ml) was adjusted to 1.25 g/ml with KBr and centrifuged in a 100 Ti rotor (Beckmann) at 75,000 RPM for 24 hours. All plasma lipoproteins ($\rho < 1.25$ g/ml) were removed by discarding the supernatant and CRP was purified by affinity chromatography from plasma density fraction $\rho > 1.25$ mg/ml. Briefly, EDTA was first removed from samples by an overnight dialysis step against Tris-buffered saline. The EDTA-free $\rho > 1.25$ g/ml plasma protein fraction was then incubated with 75 μl of phosphoethanolamine covalently immobilised on activated CH-Sepharose beads (activated CH sepharose 4B, Amersham Biosciences) in a Tris-calcium buffer (140 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM CaCl₂, pH8) for 45 min at room temperature. Afterward, beads were washed thoroughly with Tris-calcium buffer (2 ml) and CRP was specifically eluted using 10 mM phosphocholine in Tris-calcium buffer. Recovered proteins were then subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel (16%) for 3 hours at 150V. Coomassie blue

staining and pure human CRP (Fitzgerald Industries International, Concord, MA) in a control lane on the gel were used to identify the band corresponding to isolated CRP monomers. CRP immunoblotting and peptide mass fingerprint analyses were used to respectively confirm the absence of CRP in other plasma density fractions and the purity of isolated CRP (data not shown). Concentrations of CRP in the $\rho > 1.25$ g/ml plasma fraction were systematically lower than plasma CRP concentrations (mean recovery $58 \pm 22\%$), but a strong correlation was observed between both concentrations ($R^2 = 0.934$, $P < 0.0001$). Assuming that the loss in recovery from the $\rho > 1.25$ g/ml was not related to a loss of a specific intravascular pool of CRP, a linear regression equation was used to adjust values from the $\rho > 1.25$ g/ml fraction back to plasma concentrations:

$$\text{Corrected CRP}_{\text{plasma}}(\text{mg/l}) = 1.558 * \text{CRP}_{\rho > 1.25} + 0.117$$

where 1.558 and 0.117 represent respectively the slope and the intercept of the regression between CRP measured in the plasma and in the $\rho > 1.25$ g/ml density fraction.

Isotopic enrichment measurements

Gel bands containing CRP were hydrolyzed in HCl 6N at 110 °C for 24 hrs. Recovered amino acids were derivatized using trifluoroacetic acid/trifluoroacetic acid anhydride and leucine isotopic ratio was determined at each kinetic time point by GC-MS using single ion monitoring (m/z 209 and 212).

Determination of CRP kinetics

By fitting the CRP tracer enrichment data [m/z 212/(209+212)] over time from each individual to a monoexponential function using the SAAMII software (University of Washington, Department of Bioengineering, Seattle) (23), an estimate of the fractional catabolic rate (FCR) of CRP was derived for each study participant. Enrichment data were fitted to the mathematical function $Z(t) = Z_p(1 - e^{-k(t-d)})$ where $Z(t)$ is the enrichment ratio at time t , Z_p is the enrichment ratio corresponding to the plateau of the curve representing the precursor amino acid pool, d is the delay time in hours, and k is the FCR in pools per hour. We have used the enrichment ratio [m/z 212/(209+212)] rather than the tracer to tracee ratio (m/z 212/209) because recent mathematical modeling of enrichment data has shown that the

later tends to overestimate the actual fractional synthetic rate, particularly when enrichment values are low, such as with CRP (23). The enrichment plateau of VLDL apoB-100 with deuterium-labeled leucine was used as the forcing function for precursor pool enrichment because CRP synthesis is believed to occur mostly in the liver. CRP levels remained in steady state over the 12 hours of our study protocol (data not shown), which is a prerequisite for the calculation of FCR. Absolute production rate (PR) was calculated (in mg/d) using the formula:

$$\text{PR} = \text{FCR (pools/d)} \times \text{pool size (mg/pool)}$$

Pool size was calculated as the plasma concentration of CRP (mg/l) multiplied by the estimated plasma volume (value fixed at 0.045 l/kg body weight (24,25)).

Statistical analysis

Statistical analyses were undertaken using SAS (v9.0, SAS Institute Inc, Cary, NC). Analysis of variance for repeated measures with main effect of time as the repeated measure was used to assess steady state of CRP concentrations over the 12-hour kinetic time course (data not shown). Unpaired t-tests were used to compare CRP kinetic values between sexes and individuals with and without MetSyn. CRP concentrations, PS and PR as well as IL-6 data were log(e) transformed prior to analysis because of the skewness of their distribution. Pearson correlation analysis was used to assess relationship between CRP kinetic data and metabolic and anthropometric variables. In analyses including all subjects, generalized linear modeling (GLM) and regression analyses were conducted to assess the contribution of sex to the associations between CRP kinetics and metabolic and anthropometric variables. Regression analyses were also used to dissect out the respective association between the FCR and PR of CRP and metabolic and anthropometric variables. Finally, the correlations between the PR of CRP and CRP plasma concentrations and between the FCR of CRP and CRP plasma concentrations were compared using the CALIS procedure.

Results

Subject characteristics are presented in Table 7.1. Men as a group were significantly younger than women and were characterised by a less favourable metabolic profile. As a result, more men were characterized by the MetSyn (8 men vs. 1 woman). The most frequent features of the MetSyn in men were high blood pressure (56%), waist girth > 102 cm (44%) and HDL-C < 1.03 mmol/l (38%). Most frequent features of the MetSyn among women were HDL-C < 1.30 mmol/l (50%) and waist girth > 88 cm (31%). Plasma CRP concentrations were not statistically different between men and women.

The pool size and PR of CRP tended to be higher among men, although the difference did not reach statistical significance (Figure 7.1). Men had a 60% higher mean FCR of CRP than women ($P=0.03$) but this difference was no longer significant ($P=0.553$) in a multivariate model that included waist girth, HDL-C, TG, apoB100, adiponectine and IL-6 concentrations. The PR and FCR of CRP were strongly correlated ($r=0.73$ $P<0.0001$, data not shown). In an analysis where participants were grouped according to current CRP cut off values used to estimate the risk of CVD (Figure 7.2), variations in circulating concentrations of CRP were more strongly associated with variations in the PR rather than the FCR of CRP. Plasma CRP concentrations also showed stronger correlation with its PR ($r=0.80$, $P<0.0001$) than with its FCR ($r=0.39$, $P<0.05$, $P<0.0001$ for the comparison of the correlation coefficients).

Associations between CRP kinetics and metabolic and anthropometric variables were investigated within each sex separately and in all subjects combined. In men, positive trends were observed between the PR of CRP and LDL apoB-100 concentrations ($r=0.50$, $P<0.056$), IL-6 concentrations ($r=0.48$, $P<0.068$), waist girth ($r=0.44$, $P=0.10$) and BMI ($r=0.45$, $P=0.096$). In women, the PR of CRP was inversely associated with HDL-C ($r=-0.52$, $P<0.05$), apoA-I ($r=-0.51$, $P<0.05$) and adiponectin concentrations ($r=-0.70$ $P=0.003$), positively associated with IL-6 concentrations ($r=0.66$, $P<0.01$), waist girth ($r=0.52$, $P=0.04$) and BMI ($r=0.56$, $P=0.02$), and a positive trend was observed between the PR of CRP and plasma TG concentrations ($r=0.49$, $P<0.056$). Combined analysis of men and women adjusted for sex yielded positive associations between CRP PR and waist girth (Figure 7.3), BMI ($r=0.56$, $P=0.004$, *not shown*) and IL-6 concentrations ($r=0.61$,

$P=0.0008$, *not shown*), and negative associations between CRP PR and HDL-C ($r=-0.47$, $P=0.03$, *not shown*) and adiponectin concentrations (Figure 7.4). Weaker associations were also observed between the PR of CRP and LDL apoB-100 ($r=0.42$, $P=0.08$), total-to-HDL cholesterol ratio ($r=0.43$, $P=0.06$), plasma TG ($r=0.41$, $P=0.06$) and apoA-I ($r=-0.43$, $P=0.06$). The relationships between CRP PR and BMI, waist girth and plasma adiponectin concentrations remained significant after further adjustment for sex and the FCR of CRP. Interestingly, these three relationships also remained significant even after inclusion of IL-6 as covariate in the multiple regression analysis (BMI: $P=0.0003$, waist girth: $P=0.005$ and adiponectin: $P=0.01$ respectively). In general, the FCR of CRP showed weaker associations with metabolic and anthropometric variables and adjustment for either sex, waist girth or the PR of CRP completely nullified all of these relationships.

CRP kinetic was finally investigated according to the cumulative number of MetSyn features. As shown in Figure 7.5, there was a gradual increase in the PR of CRP with the number of features of the MetSyn while no significant difference was observed in the FCR of CRP between the 3 groups. Adjustment for sex had no impact on these results.

Discussion

The aim of this study was to investigate for the first time the intravascular kinetic of CRP in men and women using endogenous labelling methods, and its relationship with features of the MetSyn and other risk factors for CVD.

We described a new method allowing the investigation of the *in vivo* kinetic of CRP in humans using stable isotopes, in which pure CRP was isolated from the plasma fraction $\rho > 1.25$ g/ml obtained at predetermined time points during a 12-hour primed-constant infusion of a 5,5,5-²D₃-L-leucine isotopomer. The $\rho > 1.25$ g/ml plasma fraction allowed the use of relatively high concentrations of calcium (10 mM) to facilitate the calcium-dependent interaction between CRP and its natural ligands without the occurrence of clotting. This plasma fraction was shown to contain essentially all recoverable plasma CRP as assessed by western blot analysis and was free of lipoprotein-associated phospholipids that could have interfered with the binding of CRP to the phosphoethanolamine covalently linked to activated CH-sepharose beads. The purity of CRP obtained with the purification protocol used was confirmed by its electrophoretic properties and peptide mass fingerprint that perfectly matched that of commercially available human pure CRP (data not shown). Together, these observations confirmed that the present CRP purification protocol using the $\rho > 1.25$ g/ml plasma fraction was suitable for the kinetic study of endogenously labelled CRP. The use of a 12-hour primed-constant infusion was justified by two reasons. First, in the only report to date of *in vivo* CRP kinetics in humans (26), the turnover rate of CRP was shown to be approximately three times faster than that of LDL apoB-100 (27), which have been extensively studied in the past using 12-hour tracer infusions. Our study showed that a primed-constant infusion of 5,5,5-²D₃-L-leucine over 12 hours yields CRP enrichment that allow the determination of intravascular kinetic parameters. Second, CRP is thought to be mainly synthesised by hepatocytes and it was possible, using the plateau enrichment values of VLDL apoB-100, to estimate the intra-hepatic precursor pool, which is a prerequisite in multicompartmental modelling of kinetic data.

The only previous study of human CRP kinetic have been conducted using exogenously radio-labelled CRP (26). The mean FCR of plasma CRP reported by Vigushin *et al.* was substantially higher than values in our study using prime-constant infusion of stable isotope

in the fed state (0.9 ± 0.2 pool/d vs. 0.46 ± 0.27 pool/d). Previous studies have shown that exogenous labelling of protein may yield slightly different FCRs compared to endogenous labelling, probably due to subtle protein alteration during *in vitro* iodination, resulting in accelerated or reduced catabolism (28,29,30). Despite the fact that radio-iodinated CRP was reported to exhibit similar physico-chemical properties and kinetic in mice and rabbit compared to unlabelled human CRP (26) it is still possible that iodination of CRP led to modifications that have resulted in an accelerated catabolism in humans. It is unlikely that the fed state used in the present study may have been responsible for differences in CRP FCR compared to the study of Vigushin *et al.*, since it has been shown that acute intake of calories has essentially no impact on plasma CRP levels (31,32). Finally, we and Vigushin *et al.* have consistently shown that the PR of CRP, not its FCR, was the key determinant of CRP pool size.

The relatively large differences in CRP PR and PS between sexes were not significant. The apparent difference in the FCR of CRP between men and women was also no longer significant in a multivariate model that included several features associated with the MetSyn. This suggests that differences in the risk profile between sexes confounded to a significant extent the difference in the FCR of CRP between men and women. Based on this, it appears unlikely that gender has an independent influence on intravascular CRP kinetics but additional studies are needed to further investigate this possibility.

The positive correlation between the PR and the FCR of CRP was of interest. Several hypotheses can explain this apparent artefact. First, the FCR is used directly in the calculation of the PR. Secondly, we currently know very little on the *in vivo* kinetic of CRP and it is possible that there are compensatory mechanisms through which an increased PR of CRP is counterbalanced by an increased clearance. However, this possibility is not entirely supported by the shape of the association between CRP concentrations and its FCR, which appeared to plateau at CRP concentrations > 1.0 mg/l. Rather, this suggests that CRP clearance may reach a maximum rate and remain stable in the presence of higher CRP concentrations. While the hypothesis of a maximal clearance rate would be consistent with the previous demonstration of an unchanged FCR of CRP during acute phase when

CRP concentrations are dramatically increased (26), this issue will have to be further clarified in future studies.

Among both sexes, but more strongly so in women, CRP PR was positively associated with indices of obesity such as BMI and waist girth. A strong positive correlation between CRP PR and IL-6 and a strong negative association between CRP PR and plasma adiponectin concentrations were also observed. This is consistent with the hypothesis according to which the inflammatory state associated with the MetSyn may be the result of a combination of two key factors: 1) an increased secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 by the adipose tissue or infiltrating macrophages (33) and 2) a reduced secretion of anti-inflammatory factors such as adiponectin attributed to excessive adiposity or, perhaps more importantly, to reduced adipocyte metabolic efficiency (34). Interestingly, the correlations between the PR of CRP and BMI and waist girth remained significant even after adjustment for the FCR or CRP, sex and plasma IL-6 and adiponectin concentrations, thereby suggesting independent contributions of both obesity and endocrine factors to sustaining low-grade chronic inflammation.

This study has apparent limitations, two of which being the study sample size and the relatively low proportion of individuals with MetSyn, especially among women. First, it should be emphasized that our sample size of 31 comprising both men and women is rather large compared to most *in vivo* kinetic studies conducted in humans to date. It should also be noted that despite the low prevalence of the MetSyn in women, some of its key features such as low HDL-C and elevated waist girth were present in high proportions (50% and 31% respectively). Associations between the PR of CRP and metabolic variables were also stronger in females than in males. Based on this, we hypothesize that a higher prevalence of the MetSyn among female participants would most likely have strengthened the observed associations, since MetSyn features are generally thought to be synergistically interrelated. Finally, statistical adjustments for sex generally had no impact on the purported associations between the PR of CRP and features of the MetSyn.

In conclusion, this first investigation of CRP kinetic using endogenous labelling of proteins with stable isotopes in men and women brings evidence that plasma CRP concentrations appear to be determined mainly by its rate of production rather than by its rate of clearance.

Our observations also emphasized the importance of obesity as well as of adipose tissue-derived cytokines such as adiponectin and IL-6 as key correlates of *in vivo* CRP production. Interestingly, plasma LDL cholesterol concentrations and hypertension were not related to variations in *in vivo* CRP kinetic. Finally further studies are warranted to investigate how the MetSyn as an entity, rather than its individual features, contributes to variations in intravascular CRP kinetic, especially in women.

Acknowledgements

This study was supported in part by the Canada Research Chair in Nutrition and Cardiovascular Health and by the Fonds Québécois de Recherche en Nature et Technologies. Jean-François Mauger is a recipient of a Studentship from the Canadian Institutes of Health Research. André Tchernof is the recipient of a Canadian Institutes of Health Research New Investigator Scholarship. The authors wish to thank Dr. Mark B. Pepys and Dominique Michaud for their technical advice on CRP purification. The authors are also indebted to study participants as well as Amélie Charest, Danielle Aubin, Johanne Marin, George Cousineau, Dominique Michaud and Karine Coenen for their most valuable technical assistance.

References

1. Fischer, C. L., Gill, C., Forrester, M. G., and Nakamura, R. 1976 Quantitation of "acute-phase proteins" postoperatively. Value in detection and monitoring of complications. *Am J Clin Pathol* 66:840-846
2. Getz, G. S. 2005 Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Immune function in atherogenesis. *J Lipid Res* 46:1-10
3. Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P., Gallimore, J. R., and Pepys, M. B. 2000 Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 321:199-204
4. Folsom, A. R., Aleksic, N., Catellier, D., Juneja, H. S., and Wu, K. K. 2002 C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Am Heart J* 144:233-238
5. Kuller, L. H., Tracy, R. P., Shaten, J., and Meilahn, E. N. 1996 Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 144:537-547
6. Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., and Rifai, N. 2000 C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342:836-43
7. Danesh, J., Wheeler, J. G., Hirschfield, G. M., Eda, S., Eiriksdottir, G., Rumley, A., Lowe, G. D., Pepys, M. B., and Gudnason, V. 2004 C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-1397
8. Lowe, G. D. and Pepys, M. B. 2006 C-reactive protein and cardiovascular disease: weighing the evidence. *Curr Atheroscler Rep* 8:421-428

9. Fogli-Cawley, J. J., Dwyer, J. T., Saltzman, E., McCullough, M. L., Troy, L. M., Meigs, J. B., and Jacques, P. F. 2007 The 2005 Dietary Guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 86:1193-1201
10. Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G., and Shaw, J. 2005 The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12:295-300
11. Nash, D. T. 2005 Relationship of C-reactive protein, metabolic syndrome and diabetes mellitus: potential role of statins. *J Natl Med Assoc* 97:1600-1607
12. Rutter, M. K., Meigs, J. B., Sullivan, L. M., D'Agostino, R. B., Sr., and Wilson, P. W. 2004 C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 110:380-385
13. Ford, E. S., Ajani, U. A., and Mokdad, A. H. 2005 The metabolic syndrome and concentrations of C-reactive protein among U.S. youth. *Diabetes Care* 28:878-881
14. Garcia-Lorda, P., Bullo, M., Balanza, R., and Salas-Salvado, J. 2006 C-reactive protein, adiposity and cardiovascular risk factors in a Mediterranean population. *Int J Obes (Lond)* 30:468-474
15. Frohlich, M., Imhof, A., Berg, G., Hutchinson, W. L., Pepys, M. B., Boeing, H., Muehle, R., Brenner, H., and Koenig, W. 2000 Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 23:1835-1839
16. Lara-Castro, C., Fu, Y., Chung, B. H., and Garvey, W. T. 2007 Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 18:263-270
17. Desroches, S., Archer, W. R., Paradis, M. E., Deriaz, O., Couture, P., Bergeron, J., Bergeron, N., and Lamarche, B. 2006 Baseline plasma C-reactive protein concentrations influence lipid and lipoprotein responses to low-fat and high monounsaturated fatty acid diets in healthy men. *J Nutr* 136:1005-1011

18. Archer, W. R., Lamarche, B., Deriaz, O., Landry, N., Corneau, L., Despres, J. P., Bergeron, J., Couture, P., and Bergeron, N. 2003 Variations in body composition and plasma lipids in response to a high-carbohydrate diet. *Obes Res* 11:978-986
19. An, P., Rice, T., Gagnon, J., Borecki, I. B., Bergeron, J., Despres, J. P., Leon, A. S., Skinner, J. S., Wilmore, J. H., Bouchard, C., and Rao, D. C. 2000 Segregation analysis of apolipoproteins A-1 and B-100 measured before and after an exercise training program: the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:807-814
20. Friedewald, W. T., Levy, R. I., and Fredrickson, D. S. 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502
21. Bouchard, L., Vohl, M. C., Deshaies, Y., Rheume, C., Daris, M., and Tchernof, A. 2007 Visceral adipose tissue zinc finger protein 36 mRNA levels are correlated with insulin, insulin resistance index, and adiponectinemia in women. *Eur J Endocrinol* 157:451-457
22. Mauger, J. F., Couture, P., Paradis, M. E., and Lamarche, B. 2005 Comparison of the impact of atorvastatin and simvastatin on apoA-I kinetics in men. *Atherosclerosis* 178:157-163
23. Ramakrishnan, R. 2006 Studying apolipoprotein turnover with stable isotope tracers: correct analysis is by modeling enrichments. *J Lipid Res* 47:2738-2753
24. Cohn, JS, Wagner, DA, Cohn, SD, Millar, JS, and Schaefer, EJ 1990 Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (Apo) B-100 and high density lipoprotein Apo A-I production in human subjects using deuterated leucine. Effect of fasting and feeding. *J Clin Invest* 85:804-11
25. Kalra, P. R., Anagnostopoulos, C., Bolger, A. P., Coats, A. J., and Anker, S. D. 2002 The regulation and measurement of plasma volume in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 39:1901-1908

26. Vigushin, D. M., Pepys, M. B., and Hawkins, P. N. 1993 Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 91:1351-1357
27. Ruel, I. L., Couture, P., Cohn, J. S., and Lamarche, B. 2005 Plasma metabolism of apoB-containing lipoproteins in patients with hepatic lipase deficiency. *Atherosclerosis* 180:355-366
28. Ikewaki, K., Zech, L. A., Brewer, H. B., Jr., and Rader, D. J. 1996 ApoA-II kinetics in humans using endogenous labeling with stable isotopes: slower turnover of apoA-II compared with the exogenous radiotracer method. *J Lipid Res* 37:399-407
29. Beltz, W. F., Kesaniemi, Y. A., Miller, N. H., Fisher, W. R., Grundy, S. M., and Zech, L. A. 1990 Studies on the metabolism of apolipoprotein B in hypertriglyceridemic subjects using simultaneous administration of tritiated leucine and radioiodinated very low density lipoprotein. *J Lipid Res* 31:361-374
30. Ooi, E. M., Watts, G. F., Farvid, M. S., Chan, D. C., Allen, M. C., Zilko, S. R., and Barrett, P. H. 2006 High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics: comparison of radioactive and stable isotope studies. *Eur J Clin Invest* 36:626-632
31. Pepys, M. B. and Hirschfield, G. M. 2003 C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111:1805-1812
32. Blackburn, P., Despres, J. P., Lamarche, B., Tremblay, A., Bergeron, J., Lemieux, I., and Couillard, C. 2006 Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. *Obesity (Silver Spring)* 14:1747-1754
33. Aronson, D., Bartha, P., Zinder, O., Kerner, A., Markiewicz, W., Avizohar, O., Brook, G. J., and Levy, Y. 2004 Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:674-679
34. Trujillo, M. E. and Scherer, P. E. 2005 Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 257:167-175

Table 7.1. Characteristics of study participants

	Men n=15	Women n=16	P
Age (years)	44.0 (8.6)	54.8 (6.9)	0.0005
Weight (kg)	90.8 (16.9)	67.5 (12.0)	0.0001
BMI (kg/m²)	30.5 (4.3)	27.1 (4.1)	0.027
Waist girth (cm)	102 (12)	84 (10)	0.0001
Total cholesterol (mmol/l)	5.36 (0.77)	4.99 (0.70)	0.17
LDL-C (mmol/l)	3.58 (0.71)	3.05 (0.55)	0.025
HDL-C (mmol/l)	1.17 (0.28)	1.44 (0.41)	0.04
Total-C/ HDL-C	4.89 (1.44)	3.64 (0.87)	0.01
Triglycerides (mmol/l)	1.61 (0.75)	1.10 (0.46)	0.03
ApoB-100 (mmol/l)	1.13 (0.22)	0.89 (0.13)	0.001
Glucose (mmol/l)	5.27 (0.47)	5.13 (0.36)	0.38
Systolic blood pressure (mmHg)	127 (12)	112 (12)	0.0007
Diastolic blood pressure (mmHg)	81 (8)	71 (9)	0.002
CRP (mg/l)	2.04 (1.35)	2.40 (1.87)	0.83 *
IL-6 (pg/ml)	2.38 (1.06)	2.15 (2.43)	0.09 *
Adiponectin (mg/l)	8.02 (4.05)	15.73 (8.21)	0.003
% with metabolic syndrome	44	6	-

Values are presented as mean (SD)

BMI: Body mass index, **CRP:** C-reactive protein, **IL-6:** interleukin-6

* Log transformed data were used for the between-sex comparison.

Figure legend

Figure 7.1: Difference in CRP kinetic between men (n=15) and women (n=16). Mean values (shown within bars) correspond to geometric mean \pm standard error of the mean for the PS and PR of CRP and mean \pm standard error of the mean for the FCR of CRP. PS: Pool size; PR: Production rate; FCR: Fractional catabolic rate.

Figure 7.2: Mean production rate (PR) of CRP (top panel) and fractional catabolic rate (FCR) of CRP (bottom panel) among subjects grouped according to proposed CRP cut-off values for CVD risk management (CRP < 1.0 mg/l = low risk, CRP between 1.0 and 3.0 mg/l = intermediate risk, CRP > 3.0 mg/l = high risk). Bars represent geometric means \pm standard error of the mean for the PR of CRP and mean \pm standard error of the mean for the FCR of CRP; m=men, w=women.

Figure 7.3: Relationship between the production rate (PR) of CRP and waist girth. Gray circles represent men, open circles represent women, dotted lines represent 95% confidence interval. P-value adjusted for sex and PR of CRP.

Figure 7.4: Relationship between CRP kinetic and the number of metabolic syndrome-related features. Gray circles represent men, open circles represent women, dotted lines represent 95% confidence interval. P-value adjusted for sex and PR of CRP.

Figure 7.5: Production rate (PR- top panel) of CRP and fractional catabolic rate (FCR- lower panel) of CRP with increasing number of features of the metabolic syndrome. P-values for between-group comparisons are adjusted for sex. Bars represent geometric mean \pm standard error of the mean for the PR of CRP and mean \pm standard error of the mean for the FCR of CRP; m=men, w=women.

Figure 7.1

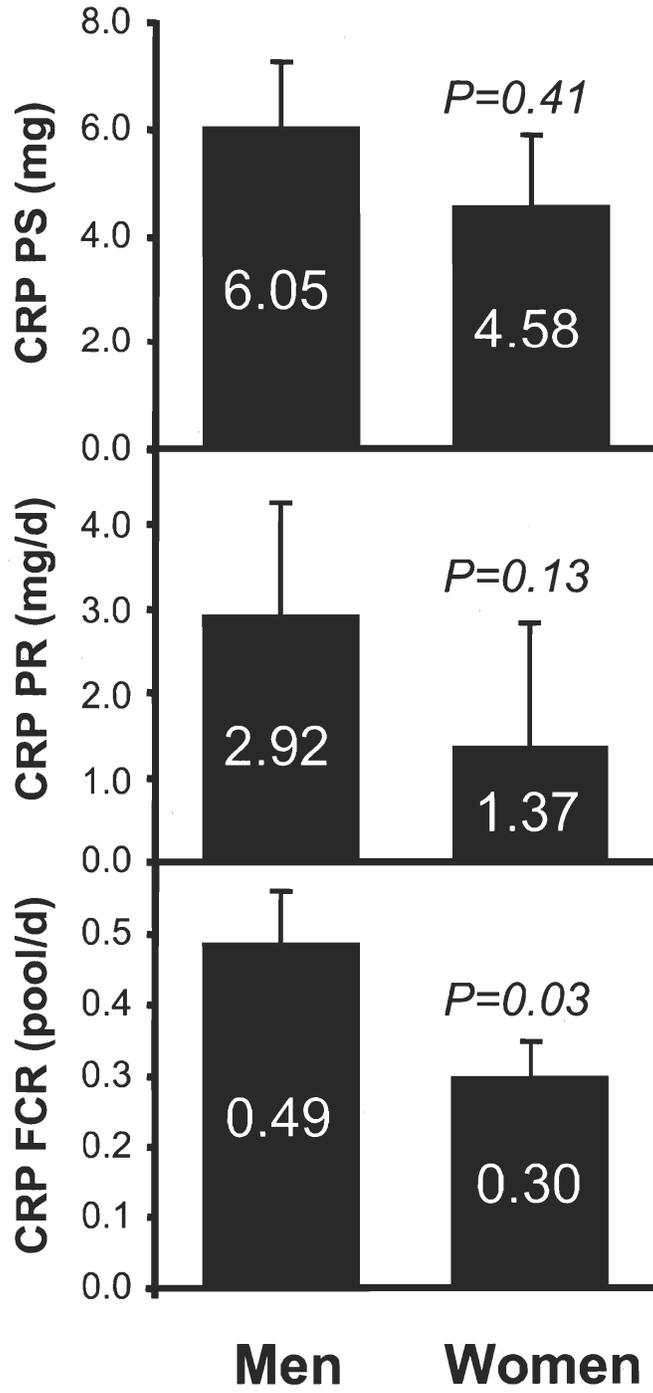


Figure 7.2

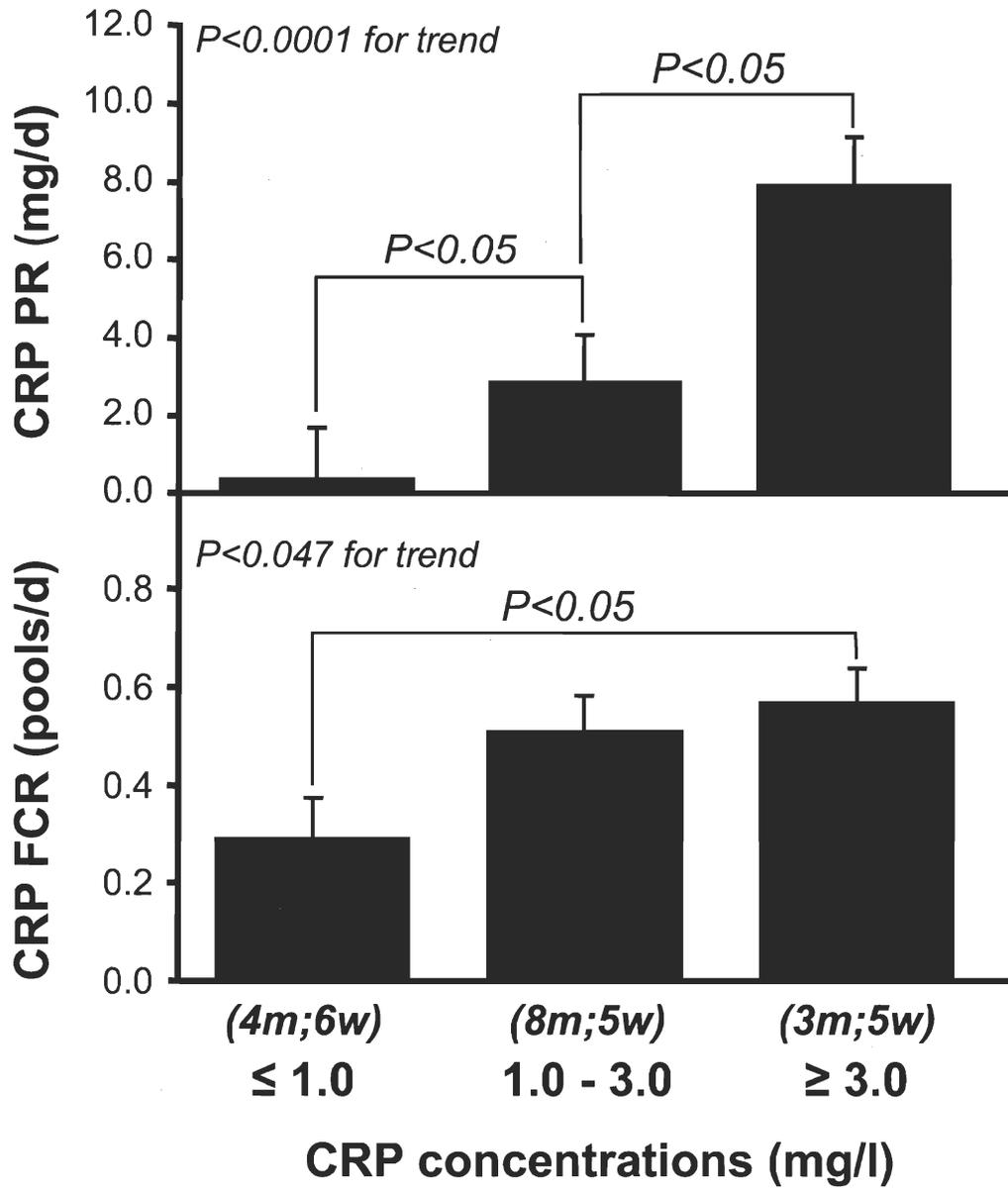


Figure 7.3

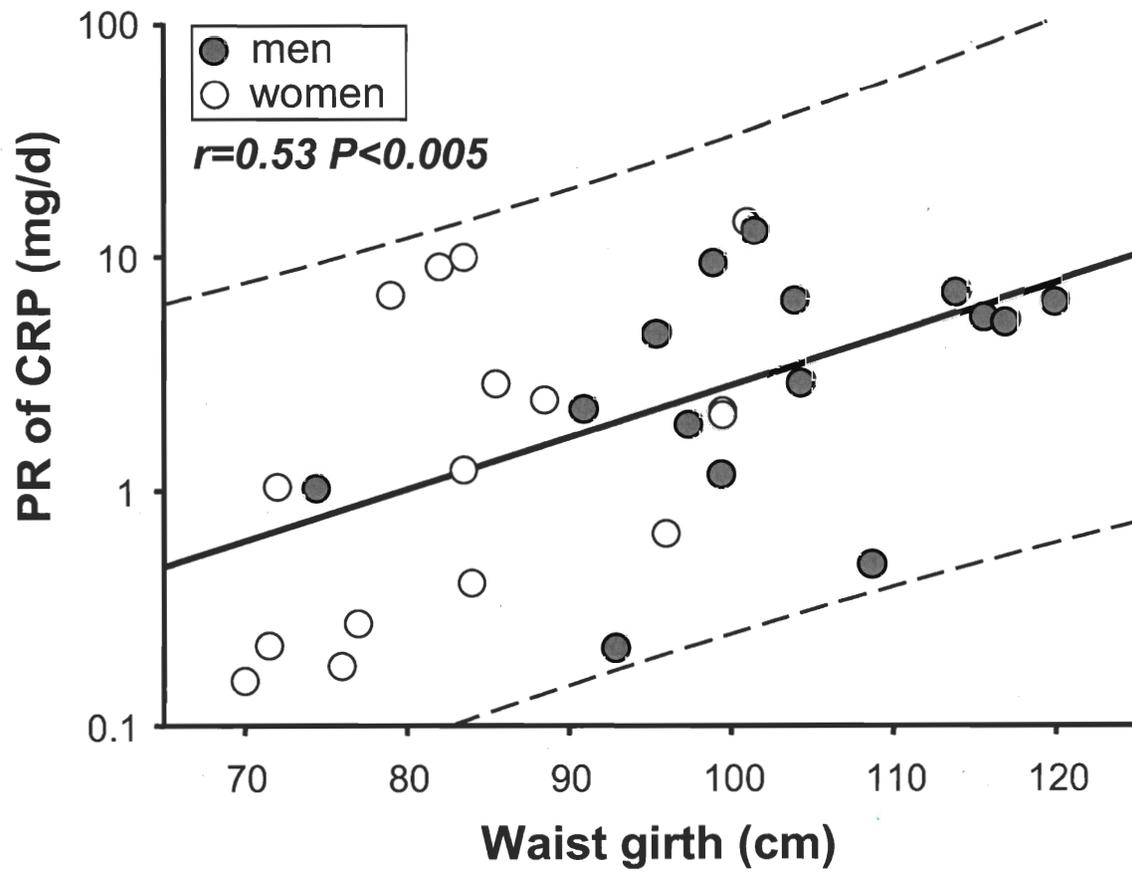


Figure 7.4

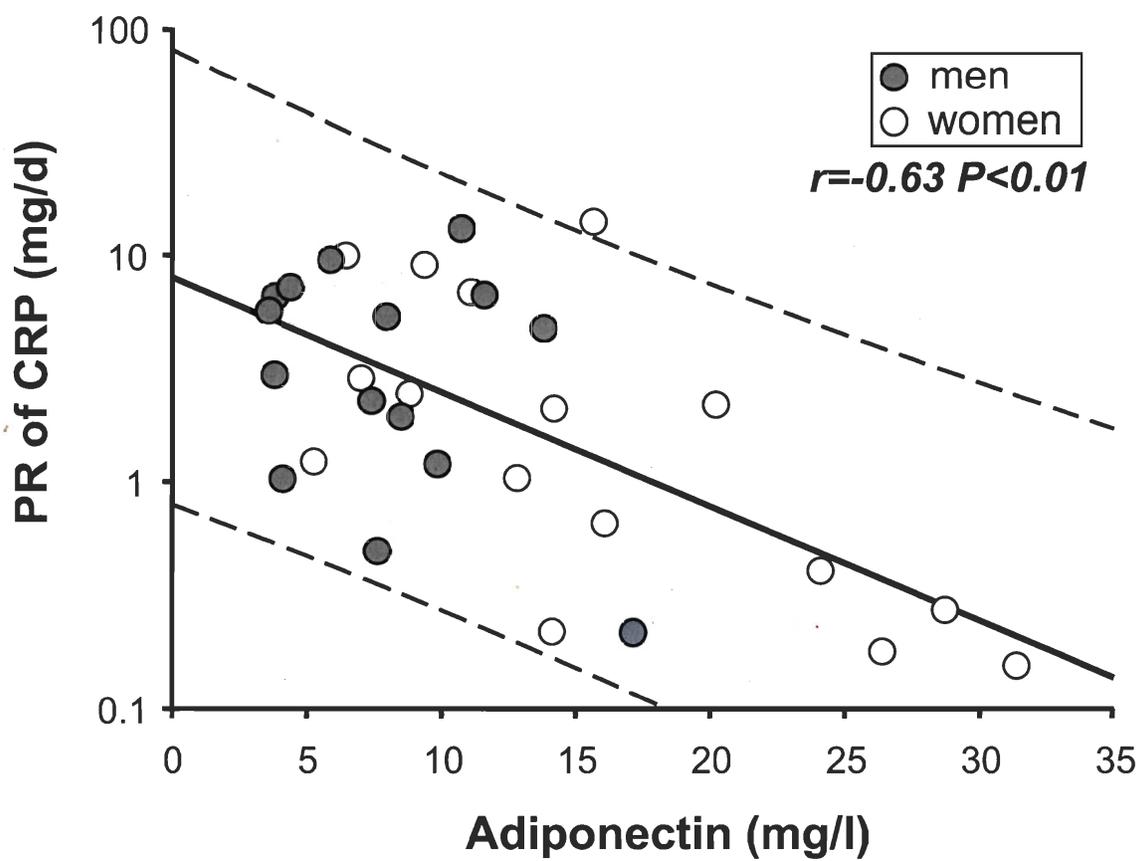
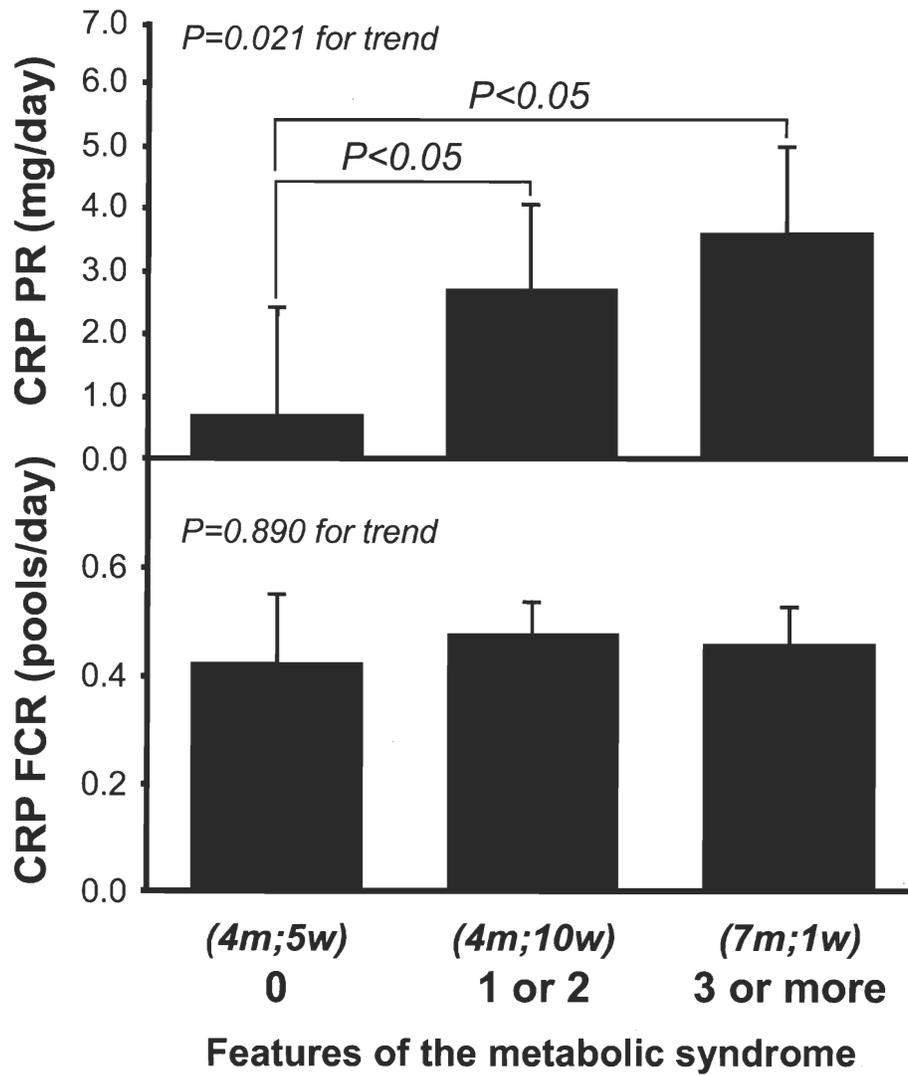


Figure 7.5



Chapitre 8. Conclusion

Retombées actuelles et éventuelles des travaux

Le présent projet de doctorat avait pour but d'étudier in vivo chez l'humain le métabolisme de certaines protéines considérées comme facteurs de risque de maladies cardiovasculaires associées au syndrome métabolique. Ces travaux ont permis de mieux définir le métabolisme in vivo des isoformes de l'apoC-III, de la protéine C-réactive et de différentes sous-classes de LDL. De plus, ces études ont permis de cibler certaines interactions clés entre les paramètres de cinétique des protéines étudiées et les composantes du syndrome métabolique.

Les études d'observation qui constituent la présente thèse ont mené au développement d'outils expérimentaux qui devront être validés lors d'études ultérieures. Plus spécifiquement, les modèles mathématiques qui ont été construits pour l'étude de la cinétique de la CRP et des différentes classes de LDL devront être testés chez des individus présentant des profils métaboliques altérés. Ceci permettra de déterminer si leur niveau de complexité est suffisant pour quantifier les anomalies susceptibles d'être présentes au niveau du métabolisme de ces deux facteurs dans diverses conditions métaboliques. Si ces modèles sont validés, ceux-ci pourront ensuite être utilisés pour comparer des individus présentant divers profils de risque et pour parfaire la compréhension des mécanismes sous-jacents à ces conditions. Ces méthodes auraient aussi le potentiel de fournir de l'information précieuse sur la modulation du métabolisme de la CRP et des sous-classes de LDL en contexte d'interventions nutritionnelles ou pharmacologiques, ce que pratiquement aucune étude n'a encore examiné.

En lien avec l'étude des isoformes de l'apoC-III, il pourrait aussi être intéressant d'examiner séparément la cinétique de chacune des isoformes de l'apoC-III dans les fractions VLDL et HDL. Si l'observation in vitro de l'affinité accrue de l'apoC-III₂ pour les VLDL comparativement aux autres isoformes est aussi présente in vivo, ceci pourrait potentiellement engendrer des différences observables, notamment au niveau de la distribution des isoformes entre les VLDL et les HDL et au niveau de la cinétique des isoformes en lien avec le catabolisme de l'apoB-100 des VLDL. La réalisation de ces

expériences pourrait permettre d'appuyer le modèle proposé pour expliquer l'association unissant la production d'apoC-III₂ à la proportion de LDL denses en circulation, soit le ralentissement préférentiel du catabolisme des VLDL par l'apoC-III₂.

Le modèle développé pour l'étude de la cinétique des sous-classes de LDL au chapitre 6 mériterait, étant donnée sa complexité, d'être complété par le dosage de certains facteurs métaboliques susceptibles d'être impliqués directement dans le métabolisme et le remodelage des lipoprotéines. L'absence de corrélation entre les FCR des différentes sous-classes de LDL suggère que celles-ci pourraient être prises en charge par différents mécanismes physiologiques et supporte en quelque sorte la pertinence de ces analyses supplémentaires. Les lipases lipoprotéique et hépatique et la CETP sont fortement susceptibles d'être impliquées dans le remodelage du contenu lipidique des LDL et il serait donc intéressant de tester si leur concentration ou leur activité respective pourrait être associée aux différents taux de conversion estimés par modélisation pluricompartimentale. De plus, il serait pertinent d'intégrer la cinétique de différentes sous-classes de VLDL (VLDL₁ et VLDL₂) à l'étude de la cinétique des sous-classes de LDL afin de mieux caractériser le lien unissant la production hépatique de triglycérides et le métabolisme intravasculaire des LDL. Enfin, étant donné l'association observée au chapitre 5 entre le taux de production de l'isoforme di-sialylée de l'apoC-III et la proportion de LDL denses en circulation, il serait évidemment intéressant d'examiner si la cinétique de l'apoC-III₂ sur 96 heures pourrait être reliée au métabolisme intravasculaire des différentes sous-classes de LDL. Considérer l'ensemble de ces facteurs permettrait certainement d'optimiser la vue d'ensemble du métabolisme des lipoprotéines plasmatiques athérogènes et de mieux caractériser les facteurs métaboliques susceptibles de contribuer à l'augmentation du potentiel athérogénique des LDL dans le contexte du syndrome métabolique.

Synthèse des conclusions obtenues et perspectives futures en lien avec le syndrome métabolique

Les trois facteurs étudiés lors de la présente thèse appartiennent à trois systèmes relativement distincts de la physiologie humaine. L'apoC-III jouerait un rôle dans le métabolisme des triglycérides et sa fonction pourrait être associée à la régulation du métabolisme énergétique. La protéine C-réactive, malgré son rôle nébuleux, est une

composante classique de la réponse inflammatoire. Les LDL et les HDL, quant à elles, constituent les principaux véhicules du cholestérol intravasculaire et assurent l'homéostasie cellulaire du cholestérol en servant à la fois de source de cholestérol en cas de manque (principalement les LDL) et de mécanisme de vidange en cas d'excès (principalement les HDL).

La disparité des rôles physiologiques des facteurs étudiés met en évidence la complexité des interrelations unissant les différentes composantes du syndrome métabolique. Les principales conclusions des présents travaux montrent que le taux de production de l'apoC-III₂ serait intimement lié à la proportion de LDL denses en circulation ; que le taux de production de la CRP serait positivement associé au degré d'adiposité et à la dyslipidémie athérogène et inversement associé aux concentrations plasmatiques d'adiponectine ; et finalement que la triglycéridémie serait étroitement liée au comportement intravasculaire et à la taille des différentes sous-classes de LDL.

Inévitablement, l'interrelation entre les multiples facettes du syndrome métabolique fait en sorte qu'il est tentant de spéculer sur la hiérarchie de ses différentes composantes et sur la présence d'une anomalie centrale qui constituerait la source de l'ensemble des désordres physiologiques associés au syndrome métabolique. Le concept d'une anomalie centrale est particulièrement attrayant dans le contexte de la prévention et du traitement du syndrome métabolique : le traitement de cette anomalie pourrait permettre le traitement du syndrome dans son ensemble. Les présents travaux, tout comme la vaste majorité de la littérature scientifique se rapportant au syndrome métabolique, ne fournissent aucun indice quant à l'existence d'une telle hiérarchie ou d'une telle composante physiologique centrale. Il paraîtrait plus prudent d'affirmer que le développement concomitant des désordres du syndrome métabolique serait dû à un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux (10, 179). Les facteurs génétiques, dont la plupart sont inconnus, définiraient la capacité de stockage, de gestion ou d'oxydation des substrats énergétiques et détermineraient la propension d'un individu à développer le syndrome métabolique. Les facteurs environnementaux consisteraient principalement en la présence d'un apport énergétique excédant ou nuisant à cette capacité de gestion énergétique et permettraient l'expression, plus ou moins sévère, des anomalies associées au syndrome.

Cette hypothèse est en partie appuyée par l'ensemble des observations revues dans la section 1 décrivant les connaissances actuelles de la pathophysiologie du syndrome métabolique. Une balance énergétique positive chronique en condition de sédentarité mènerait éventuellement à une saturation des capacités de stockage du tissu adipeux et éventuellement au stockage ectopique des graisses (55, 168). Le tissu adipeux hypertrophié, métaboliquement handicapé, serait propice à l'infiltration de monocytes, ce qui favoriserait la perte de sensibilité à l'insuline des adipocytes et contribuerait au développement d'un état inflammatoire systémique (174). Le tissu adipeux résistant à l'insuline sécrèterait davantage d'acides gras libres en raison de la mauvaise régulation de l'activité des lipases impliquées dans le relargage d'acides gras (148, 149). Au niveau du muscle squelettique, la disponibilité accrue d'acides gras libres se traduirait par l'accumulation de lipides, la réduction de la captation du glucose et la perte de sensibilité à l'insuline (45, 168). Au niveau du foie, les acides gras libres stimuleraient la néoglucogenèse et la sécrétion hépatique de triglycérides (151, 152). La diminution de l'oxydation musculaire du glucose et la néoglucogenèse hépatique soutenue contribueraient au maintien d'une glycémie élevée et au déclin des cellules- β pancréatiques. La sécrétion accrue de triglycérides et le ralentissement de leur catabolisme favoriseraient le développement de la plupart des anomalies lipidiques associées au syndrome métabolique, soient l'effondrement des concentrations de HDL, l'augmentation du nombre de lipoprotéines athérogènes circulantes et la diminution de la taille des particules LDL (179, 518). Enfin, le développement de la résistance à l'insuline au niveau vasculaire et le métabolisme altéré des hormones au niveau du tissu adipeux serait intimement relié à la détérioration de la fonction endothéliale et à l'hypertension (213, 217).

Ce résumé extrême des désordres physiologiques associés au syndrome métabolique souligne la toxicité potentielle d'un apport énergétique excessif chronique. En retour, la gravité des répercussions physiologiques de cet excès chez un individu dépendrait de sa capacité à faire face à un tel défi métabolique, capacité qui serait probablement définie par un ensemble complexe de gènes et de facteurs épigénétiques.

À la lumière du consensus actuel, même en absence d'une composante centrale au syndrome métabolique, deux avenues de traitement ou de prévention peuvent être

imaginées. L'une viserait à augmenter la capacité de stockage et d'oxydation de l'organisme. L'autre ciblerait le rétablissement de l'équilibre entre l'apport et la dépense énergétique.

La première option est principalement reliée aux efforts de la recherche pharmaceutique. Ceux-ci ont jusqu'à maintenant réussi à produire quelques molécules bioactives capables de masquer partiellement les effets délétères de l'apport énergétique excessif sur la santé (statines, fibrates, metformine, thiazolidinediones, ezetimibe, etc). Bien que ces molécules aient contribué largement à la diminution de la mortalité attribuable à la MCV et à la prospérité des populations industrialisées (1, 2, 8), la surconsommation énergétique qu'ils supportent indirectement rend cette alternative thérapeutique difficilement acceptable à long terme. La consommation excessive qui caractérise les sociétés industrialisées a de graves répercussions qui vont bien au-delà de la santé des populations et ce fait n'est que trop peu souvent soulevé. Du point de vue écologique et environnemental, la dépendance aux combustibles fossiles pour la transformation et le transport des denrées alimentaires, l'agriculture intensive et l'utilisation d'engrais chimiques, d'insecticides et de pesticides pour l'optimisation des récoltes ne sont que quelques exemples d'éléments qui ont des conséquences néfastes sur la qualité de l'air et de l'eau, sur la biodiversité des écosystèmes, sur la capacité de production primaire nette de la terre et, ultimement, sur la qualité de vie des populations. Ainsi, dans le contexte actuel, les bénéfices apportés par la médication sont largement contrebalancés par les problèmes directement liés aux habitudes de consommation des populations industrialisées.

La deuxième avenue de prévention et de traitement du syndrome métabolique, qui consisterait à rétablir et à maintenir l'équilibre entre l'apport et la dépense énergétique implique davantage des changements au plan des habitudes de vie. À ce titre, les données scientifiques s'accumulent quant au fait que la restriction calorique combinée à la pratique d'activité physique serait équivalente, sinon supérieure à l'intervention pharmacologique en ce qui a trait à la modulation globale des composantes du syndrome métabolique (237, 238, 253, 423). Le principal avantage des stratégies préventives ciblant la modification des habitudes de vie réside cependant dans le fait qu'elles s'intègrent harmonieusement aux

défis écologiques auxquels font face les populations industrialisées et en voie d'industrialisation.

Évidemment, la modification à grande échelle des habitudes de consommation constitue un défi de taille. La progression fulgurante de la prévalence du syndrome métabolique vient cependant enfin démontrer de façon tangible que nos habitudes de consommation sont non seulement nocives pour l'environnement, mais sont aussi profondément néfastes pour la santé. Les travaux qui composent la présente thèse sont malheureusement bien loin de proposer des moyens par lesquels les stratégies visant l'amélioration des habitudes de vie et de consommation pourront être implantées au niveau de la population. Une chose est cependant sûre : l'appréciation de l'étendue des bénéfices apportés par de tels changements, autant au plan de la santé que de l'environnement, ne devrait pas nécessiter l'obtention d'un grade de PhD...

Bibliographie

1. Unal B, Critchley JA, Capewell S 2004 Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. *Circulation* 109:1101-1107
2. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, Giles WH, Capewell S 2007 Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med* 356:2388-2398
3. Beaglehole R 2001 Global cardiovascular disease prevention: time to get serious. *Lancet* 358:661-663
4. Critchley J, Liu J, Zhao D, Wei W, Capewell S 2004 Explaining the increase in coronary heart disease mortality in Beijing between 1984 and 1999. *Circulation* 110:1236-1244
5. Baker JL, Olsen LW, Sorensen TI 2007 Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med* 357:2329-2337
6. Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L 2007 Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. *N Engl J Med* 357:2371-2379
7. Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V 2004 Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 17:35-44
8. Grundy SM 2008 Promise of low-density lipoprotein-lowering therapy for primary and secondary prevention. *Circulation* 117:569-573; discussion 573
9. Reaven GM 1988 Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607
10. Grundy SM 2008 Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:629-636
11. Alberti KG, Zimmet PZ 1998 Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553
12. 2001 Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment

- of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 285:2486-2497
13. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J 2005 The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12:295-300
 14. Reaven GM 2004 Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome: how well do the emperor's clothes fit? *Diabetes Care* 27:1011-1012
 15. Maison P, Byrne CD, Hales CN, Day NE, Wareham NJ 2001 Do different dimensions of the metabolic syndrome change together over time? Evidence supporting obesity as the central feature. *Diabetes Care* 24:1758-1763
 16. Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM, Singer DE 1997 Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 46:1594-1600
 17. Anderson PJ, Critchley JA, Chan JC, Cockram CS, Lee ZS, Thomas GN, Tomlinson B 2001 Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1782-1788
 18. Després JP, Lemieux I 2006 Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881-887
 19. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ 2005 The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415-1428
 20. Reynolds K, He J 2005 Epidemiology of the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 330:273-279
 21. Hossain P, Kavar B, El Nahas M 2007 Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 356:213-215
 22. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH 2004 Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care* 27:2444-2449
 23. Brien SE, Katzmarzyk PT 2006 Physical activity and the metabolic syndrome in Canada. *Appl Physiol Nutr Metab* 31:40-47
 24. Nilsson PM, Engstrom G, Hedblad B 2007 The metabolic syndrome and incidence of cardiovascular disease in non-diabetic subjects--a population-based study comparing three different definitions. *Diabet Med* 24:464-472

25. Sandhofer A, Iglseider B, Paulweber B, Ebenbichler CF, Patsch JR 2007 Comparison of different definitions of the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 37:109-116
26. Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, Robinson TN, Scott BJ, St Jeor S, Williams CL 2005 Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 111:1999-2012
27. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F 2005 Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735-2752
28. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM 2007 Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 49:403-414
29. Schillaci G, Pirro M, Vaudo G, Gemelli F, Marchesi S, Porcellati C, Mannarino E 2004 Prognostic value of the metabolic syndrome in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:1817-1822
30. Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Haffner SM, Isles C, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J 2003 Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 108:414-419
31. McNeill AM, Rosamond WD, Girman CJ, Golden SH, Schmidt MI, East HE, Ballantyne CM, Heiss G 2005 The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care* 28:385-390
32. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA 2002 Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 156:1070-1077

33. Hanley AJ, Karter AJ, Williams K, Festa A, D'Agostino RB, Jr., Wagenknecht LE, Haffner SM 2005 Prediction of type 2 diabetes mellitus with alternative definitions of the metabolic syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 112:3713-3721
34. Fagan TC, Sowers J 1999 Type 2 diabetes mellitus: greater cardiovascular risks and greater benefits of therapy. *Arch Intern Med* 159:1033-1034
35. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M 1998 Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234
36. Ford ES, Li C, Sattar N 2008 Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care* 31:1898-1904
37. Cameron AJ, Zimmet PZ, Soderberg S, Alberti KG, Sicree R, Tuomilehto J, Chitson P, Shaw JE 2007 The metabolic syndrome as a predictor of incident diabetes mellitus in Mauritius. *Diabet Med* 24:1460-1469
38. Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB 2005 Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 112:3066-3072
39. Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE 1995 Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122:481-486
40. 2000 Overweight, obesity, and health risk. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. *Arch Intern Med* 160:898-904
41. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA 1999 Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 341:427-434
42. Bak JF, Moller N, Schmitz O, Saaek A, Pedersen O 1992 In vivo insulin action and muscle glycogen synthase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: effects of diet treatment. *Diabetologia* 35:777-784
43. Friedman JE, Dohm GL, Leggett-Frazier N, Elton CW, Tapscott EB, Pories WP, Caro JF 1992 Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest* 89:701-705

44. McTernan PA, A.; Kumar S. 2004 Relationship between fat distribution and insulin resistance. In: Kumar SOR, P. ed. *Insulin Resistance: Insulin Action and Its Disturbances in Disease*: John Wiley and Sons 207-236
45. Boden G 1997 Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10
46. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA 1963 The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789
47. Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E, Smith C 1991 Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 88:960-966
48. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI 1996 Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859-2865
49. Randle PJ 1998 Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14:263-283
50. Kelley DE, Mandarino LJ 2000 Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 49:677-683
51. Kelley DE, Mandarino LJ 1990 Hyperglycemia normalizes insulin-stimulated skeletal muscle glucose oxidation and storage in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 86:1999-2007
52. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H 2008 Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 31:165-169
53. Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H 2008 Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 51:130-138
54. Garg A 2006 Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 4:S7-S13

55. Robbins DC, Horton ES, Tulp O, Sims EA 1982 Familial partial lipodystrophy: complications of obesity in the non-obese? *Metabolism* 31:445-452
56. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML 2000 Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 105:271-278
57. Morino K, Petersen KF, Shulman GI 2006 Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2:S9-S15
58. Nagle CA, An J, Shiota M, Torres TP, Cline GW, Liu ZX, Wang S, Catlin RL, Shulman GI, Newgard CB, Coleman RA 2007 Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *J Biol Chem* 282:14807-14815
59. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA 2007 Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5:167-179
60. Boden G 2008 Obesity and free Fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:635-646
61. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI 1999 Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274
62. Lowell BB, Shulman GI 2005 Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387
63. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461
64. Houstis N, Rosen ED, Lander ES 2006 Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948

65. Saitoh Y, Chun-ping C, Noma K, Ueno H, Mizuta M, Nakazato M 2008 Pioglitazone attenuates fatty acid-induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic beta-cells. *Diabetes Obes Metab* 10:564-573
66. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS 2003 Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4848-4856
67. Stepan CM, Lazar MA 2004 The current biology of resistin. *J Intern Med* 255:439-447
68. Arner P 2005 Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 48:2203-2205
69. Pekala P, Kawakami M, Vine W, Lane MD, Cerami A 1983 Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator. *J Exp Med* 157:1360-1365
70. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91
71. Stephens JM, Pekala PH 1991 Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 266:21839-21845
72. Ohsumi J, Sakakibara S, Yamaguchi J, Miyadai K, Yoshioka S, Fujiwara T, Horikoshi H, Serizawa N 1994 Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 135:2279-2282
73. Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF 2002 Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51:1319-1336

74. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A 1993 Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268:26055-26058
75. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM 1994 Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4854-4858
76. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A 1995 Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 270:23780-23784
77. Solomon SS, Mishra SK, Cwik C, Rajanna B, Postlethwaite AE 1997 Pioglitazone and metformin reverse insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in liver cells. *Horm Metab Res* 29:379-382
78. Halse R, Pearson SL, McCormack JG, Yeaman SJ, Taylor R 2001 Effects of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes* 50:1102-1109
79. Li YP, Reid MB 2001 Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 13:483-487
80. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S 2007 Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56:1010-1013
81. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200
82. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808
83. Odegaard JI, Chawla A 2008 Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:619-626
84. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T,

- Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N 2008 T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1304-1310
85. Ruan H, Lodish HF 2003 Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447-455
86. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G 2003 Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 52:1779-1785
87. Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R 2003 Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor α , growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35:147-152
88. Bullo M, Garcia-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernandez M, Del Castillo D, Argiles JM, Salas-Salvado J 2002 TNF α expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:652-658
89. Fawcett RL, Waechter AS, Williams LB, Zhang P, Louie R, Jones R, Inman M, Huse J, Considine RV 2000 Tumor necrosis factor- α inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocytes from morbidly obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:530-535
90. Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP 1997 Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46:1939-1944
91. Niesler CU, Siddle K, Prins JB 1998 Human preadipocytes display a depot-specific susceptibility to apoptosis. *Diabetes* 47:1365-1368
92. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
93. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546

94. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271
95. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S 1997 Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903-908
96. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, Eriksson JW 2007 Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia* 50:625-633
97. Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL 2002 Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R226-234
98. Friedman JM, Halaas JL 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770
99. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343
100. Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I 2003 Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375:1-16
101. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P 1998 Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47:913-917
102. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E 2005 Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 162:101-114
103. Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L 2001 Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 50:2786-2791
104. Shimizu H, Oh IS, Okada S, Mori M 2007 Leptin resistance and obesity. *Endocr J* 54:17-26

105. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *JBiolChem* 270:26746-26749
106. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *BiochemBiophysResCommun* 221:286-289
107. Hu E, Liang P, Spiegelman BM 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *JBiolChem* 271:10697-10703
108. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M 1996 Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *JBiochem(Tokyo)* 120:803-812
109. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
110. Ryan AS, Berman DM, Nicklas BJ, Sinha M, Gingerich RL, Meneilly GS, Egan JM, Elahi D 2003 Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care* 26:2383-2388
111. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS 2004 Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10:524-529
112. Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K 2003 Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1594-1602
113. Pender C, Goldfine ID, Tanner CJ, Pories WJ, MacDonald KG, Havel PJ, Houmard JA, Youngren JF 2004 Muscle insulin receptor concentrations in obese patients post

- bariatric surgery: relationship to hyperinsulinemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:363-369
114. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B 2003 Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *AmJPhysiol EndocrinolMetab* 285:E527-E533
 115. Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, Mohlig M, Pfeiffer AF, Spranger J 2005 Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes* 54:2712-2719
 116. Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM, Elahi D 2003 Adiponectin levels do not change with moderate dietary induced weight loss and exercise in obese postmenopausal women. *IntJObesRelat Metab Disord* 27:1066-1071
 117. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Meigs JB 2008 Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3165-3172
 118. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA 2001 Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935
 119. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF 2003 Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361:226-228
 120. Choi KM, Lee J, Lee KW, Seo JA, Oh JH, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH 2004 Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:75-80
 121. Lindsay RS, Resnick HE, Zhu J, Tun ML, Howard BV, Zhang Y, Yeh J, Best LG 2005 Adiponectin and coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:e15-16
 122. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM, Danesh J, Whincup PH 2006 Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation* 114:623-629
 123. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson

- C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946
124. Pajvani UB, Scherer PE 2003 Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 3:207-213
125. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010
126. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295
127. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y 1999 Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476
128. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y 2000 Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296-1301
129. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE 2003 Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278:9073-9085
130. Basu R, Pajvani UB, Rizza RA, Scherer PE 2007 Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects. *Diabetes* 56:2174-2177

131. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I 2007 Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56:901-911
132. Koh EH, Park JY, Park HS, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, Kim SY, Kim MS, Kim SW, Park IS, Youn JH, Lee KU 2007 Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 56:2973-2981
133. Ye J 2009 Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 33:54-66
134. Van Snick J 1990 Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8:253-278
135. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS 1998 Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83:847-850
136. Gallistl S, Sudi KM, Aigner R, Borkenstein M 2001 Changes in serum interleukin-6 concentrations in obese children and adolescents during a weight reduction program. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1640-1643
137. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B 2000 Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342
138. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W 2001 Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1154-1159
139. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B 2002 Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084-2089
140. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G 2001 Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-751

141. Pedersen BK, Ostrowski K, Rohde T, Bruunsgaard H 1998 The cytokine response to strenuous exercise. *Can J Physiol Pharmacol* 76:505-511
142. Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP 1997 Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* 66:54-62
143. Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP 1997 Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4167-4170
144. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R 2003 Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301:1045-1050
145. Pepys MB, Hirschfield GM 2003 C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111:1805-1812
146. Montague CT, O'Rahilly S 2000 The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49:883-888
147. Bjorntorp P 1990 "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493-496
148. Laviola L, Perrini S, Cignarelli A, Natalicchio A, Leonardini A, De Stefano F, Cuscito M, De Fazio M, Memeo V, Neri V, Cignarelli M, Giorgino R, Giorgino F 2006 Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 55:952-961
149. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, Santos RF 2002 Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 34:616-621
150. Caserta F, Tchkonja T, Civelek VN, Prentki M, Brown NF, McGarry JD, Forse RA, Corkey BE, Hamilton JA, Kirkland JL 2001 Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E238-247
151. Massillon D, Barzilai N, Hawkins M, Prus-Wertheimer D, Rossetti L 1997 Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes* 46:153-157

152. Pavlic M, Valero R, Duez H, Xiao C, Szeto L, Patterson BW, Lewis GF 2008 Triglyceride-rich lipoprotein-associated apolipoprotein C-III production is stimulated by plasma free fatty acids in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1660-1665
153. Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H 1998 Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47:98-103
154. Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ, Starcynski J, Crocker J, Barnett AH, McTernan CL, Kumar S 2002 Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res* 34:650-654
155. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM 1995 Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415
156. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419
157. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R 1979 Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-223
158. Prentki M, Tornheim K, Corkey BE 1997 Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S32-41
159. MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflone K 2008 Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 49:308-323
160. Chehab FF 2008 Obesity and lipodystrophy--where do the circles intersect? *Endocrinology* 149:925-934
161. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J 1985 Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76:149-155

162. Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD, Handberg A 2001 GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes* 50:1324-1329
163. Hojlund K, Staehr P, Hansen BF, Green KA, Hardie DG, Richter EA, Beck-Nielsen H, Wojtaszewski JF 2003 Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH₂-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes. *Diabetes* 52:1393-1402
164. Moeri R, Golay A, Schutz Y, Tessler E, Jequier E, Felber JP 1988 Oxidative and nonoxidative glucose metabolism following graded doses of oral glucose in man. *Diabetes Metab* 14:1-7
165. Thorburn AW, Gumbiner B, Bulacan F, Wallace P, Henry RR 1990 Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. *J Clin Invest* 85:522-529
166. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA 1999 Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 277:E1130-1141
167. Kelley DE, Simoneau JA 1994 Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94:2349-2356
168. Levin K, Daa Schroeder H, Alford FP, Beck-Nielsen H 2001 Morphometric documentation of abnormal intramyocellular fat storage and reduced glycogen in obese patients with Type II diabetes. *Diabetologia* 44:824-833
169. Vaag A, Alford F, Henriksen FL, Christopher M, Beck-Nielsen H 1995 Multiple defects of both hepatic and peripheral intracellular glucose processing contribute to the hyperglycaemia of NIDDM. *Diabetologia* 38:326-336
170. Lewis GF, Carpentier A, Vranic M, Giacca A 1999 Resistance to insulin's acute direct hepatic effect in suppressing steady-state glucose production in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 48:570-576
171. Staehr P, Hother-Nielsen O, Levin K, Holst JJ, Beck-Nielsen H 2001 Assessment of hepatic insulin action in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50:1363-1370

172. Clore JN, Stillman J, Sugeran H 2000 Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 49:969-974
173. Caro JF, Triester S, Patel VK, Tapscott EB, Frazier NL, Dohm GL 1995 Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Horm Metab Res* 27:19-22
174. Kotronen A, Yki-Jarvinen H 2008 Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:27-38
175. Chan DC, Watts GF, Ng TW, Hua J, Song S, Barrett PH 2006 Measurement of liver fat by magnetic resonance imaging: Relationships with body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipids in healthy men. *Diabetes Obes Metab* 8:698-702
176. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H 2002 Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3023-3028
177. Tsekouras YE, Magkos F, Kavouras SA, Panagiotakos DB, Sidossis LS 2008 Estimated liver weight is directly related to hepatic very low-density lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. *Eur J Clin Invest* 38:656-662
178. Adiels M, Boren J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, Wennberg B, Olofsson SO, Packard C, Taskinen MR 2005 Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *ArteriosclerThrombVascBiol* 25:1697-1703
179. Grundy SM 2006 Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 1:S21-27
180. Després JP 1993 The insulin resistance-dyslipidemia syndrome: the most prevalent cause of coronary artery disease? *Can Med Assoc J* 148:1339-1340
181. Chan DC, Barrett PH, Watts GF 2004 Lipoprotein transport in the metabolic syndrome: pathophysiological and interventional studies employing stable isotopy and modelling methods. *Clin Sci (Lond)* 107:233-249
182. Grundy SM 1995 Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am J Cardiol* 75:45B-52B

183. Ruotolo G, Howard BV 2002 Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *CurrCardiolRep* 4:494-500
184. Cullen P 2000 Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *AmJCardiol* 86:943-949
185. Faergeman O 2000 Hypertriglyceridemia and the fibrate trials. *Curr Opin Lipidol* 11:609-614
186. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V 2007 Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 115:450-458
187. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J 2008 Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1225-1236
188. Bloomgarden ZT 2004 Dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 27:3009-3016
189. Yao Z, Tran K, McLeod RS 1997 Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J Lipid Res* 38:1937-1953
190. Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Lewis GF 2001 Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med* 11:170-176
191. Picard F, Boivin A, Lalonde J, Deshaies Y 2002 Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E412-418
192. Panarotto D, Remillard P, Bouffard L, Maheux P 2002 Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* 32:84-92
193. Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR 1998 Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:414-423

194. Chan DC, Watts GF, Redgrave TG, Mori TA, Barrett PH 2002 Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration. *Metabolism* 51:1041-1046
195. Mamo JC, Watts GF, Barrett PH, Smith D, James AP, Pal S 2001 Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity: an effect of reduced LDL receptor expression? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E626-632
196. Al-Bahrani AI, Bakhiet CS, Bayoumi RA, Al-Yahyaee SA 2005 A potential role of apolipoprotein B in the risk stratification of diabetic patients with dyslipidaemia. *Diabetes Res Clin Pract* 69:44-51
197. Williams K, Sniderman AD, Sattar N, D'Agostino R, Jr., Wagenknecht LE, Haffner SM 2003 Comparison of the associations of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol with other cardiovascular risk factors in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 108:2312-2316
198. Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, Castro Cabezas M, Chapman MJ, Couture P, de Graaf J, Durrington PN, Faergeman O, Frohlich J, Furberg CD, Gagne C, Haffner SM, Humphries SE, Jungner I, Krauss RM, Kwiterovich P, Marcovina S, Packard CJ, Pearson TA, Reddy KS, Rosenson R, Sarrafzadegan N, Sniderman AD, Stalenhoef AF, Stein E, Talmud PJ, Tonkin AM, Walldius G, Williams KM 2006 Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med* 259:247-258
199. Robins SJ 2001 Targeting low high-density lipoprotein cholesterol for therapy: lessons from the Veterans Affairs High-density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol* 88:19N-23N
200. Assmann G, Nofer JR 2003 Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 54:321-341
201. Assmann G, Schulte H 1992 Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol* 70:733-737
202. Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D 2000 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1185-1188

203. Lewis GF, Murdoch S, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Albers A, Adeli K, Brunzell JD 2004 Hepatic lipase mRNA, protein, and plasma enzyme activity is increased in the insulin-resistant, fructose-fed Syrian golden hamster and is partially normalized by the insulin sensitizer rosiglitazone. *Diabetes* 53:2893-2900
204. Clay MA, Newnham HH, Barter PJ 1991 Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. *Arterioscler Thromb* 11:415-422
205. Clay MA, Newnham HH, Forte TM, Barter PI 1992 Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim Biophys Acta* 1124:52-58
206. Pietzsch J, Julius U, Nitzsche S, Hanefeld M 1998 In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 47:1928-1934
207. Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, Barrett PH, Lewis GF 1999 Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest* 103:1191-1199
208. Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, van Tol A, Steiner G, Chapman MJ 2001 Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *ArteriosclerThrombVascBiol* 21:282-288
209. Lamarche B, Tchernof A, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Després JP 1998 Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *JAMA* 279:1955-1961
210. Krauss RM 1998 Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 81:13B-17B
211. Karpe F, Tornvall P, Olivecrona T, Steiner G, Carlson LA, Hamsten A 1993 Composition of human low density lipoprotein: effects of postprandial triglyceride-rich lipoproteins, lipoprotein lipase, hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *Atherosclerosis* 98:33-49

212. Hopkins PN, Hunt SC, Wu LL, Williams GH, Williams RR 1996 Hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance: links in a chain or spokes on a wheel? *Curr Opin Lipidol* 7:241-253
213. Hu FB, Stampfer MJ 2005 Insulin resistance and hypertension: the chicken-egg question revisited. *Circulation* 112:1678-1680
214. Jarrett RJ 1992 In defence of insulin: a critique of syndrome X. *Lancet* 340:469-471
215. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D 2004 Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *Jama* 292:1440-1446
216. Spady DK, Cuthbert JA, Willard MN, Meidell RS 1998 Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) in mice lacking the low density lipoprotein (LDL) receptor gene. LDL transport and plasma LDL concentrations are reduced. *J Biol Chem* 273:126-132
217. Reaven GM 2003 Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2399-2403
218. Shamiss A, Carroll J, Rosenthal T 1992 Insulin resistance in secondary hypertension. *Am J Hypertens* 5:26-28
219. Cleland SJ, Petrie JR, Ueda S, Elliott HL, Connell JM 1999 Insulin-mediated vasodilation and glucose uptake are functionally linked in humans. *Hypertension* 33:554-558
220. Ueda S, Petrie JR, Cleland SJ, Elliott HL, Connell JM 1998 Insulin vasodilatation and the "arginine paradox". *Lancet* 351:959-960
221. Zeng G, Quon MJ 1996 Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98:894-898
222. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL 2000 Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101:676-681

223. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G 2002 Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes* 51:168-173
224. Galletti F, D'Elia L, Barba G, Siani A, Cappuccio FP, Farinaro E, Iacone R, Russo O, De Palma D, Ippolito R, Strazzullo P 2008 High-circulating leptin levels are associated with greater risk of hypertension in men independently of body mass and insulin resistance: results of an eight-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3922-3926
225. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ 2003 Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278:45021-45026
226. Kapoor S 2007 Interleukin-6 antagonists for the management of hypertension. *Hypertension* 49:e18; author reply e19
227. Coles B, Fielding CA, Rose-John S, Scheller J, Jones SA, O'Donnell VB 2007 Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. *Am J Pathol* 171:315-325
228. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH 1994 Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 266:H2535-2541
229. Yan G, You B, Chen SP, Liao JK, Sun J 2008 Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1. *Circ Res* 103:591-597
230. de Kreutzenberg SV, Crepaldi C, Marchetto S, Calo L, Tiengo A, Del Prato S, Avogaro A 2000 Plasma free fatty acids and endothelium-dependent vasodilation: effect of chain-length and cyclooxygenase inhibition. *J Clin Endocrinol Metab* 85:793-798
231. Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM 1995 Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension* 26:764-770

232. Engeli S, Negrel R, Sharma AM 2000 Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35:1270-1277
233. Quinkler M, Stewart PM 2003 Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2384-2392
234. Fappa E, Yannakoulia M, Pitsavos C, Skoumas I, Valourdou S, Stefanadis C 2008 Lifestyle intervention in the management of metabolic syndrome: could we improve adherence issues? *Nutrition* 24:286-291
235. 1998 Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* 6 Suppl 2:51S-209S
236. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M 2001 Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343-1350
237. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM 2002 Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393-403
238. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, Fowler S 2005 The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 142:611-619
239. Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Schaefer EJ 1999 Effects of Different Forms of Dietary Hydrogenated Fats on Serum Lipoprotein Cholesterol Levels. *N Engl J Med* 340:1933-1940
240. Zanni EE, Zannis VI, Blum CB, Herbert PN, Breslow JL 1987 Effect of egg cholesterol and dietary fats on plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins of normal women consuming natural diets. *J Lipid Res* 28:518-527
241. Wardlaw GM, Snook JT 1990 Effect of diets high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. *Am J Clin Nutr* 51:815-821

242. Archer WR, Lamarche B, Deriaz O, Landry N, Corneau L, Després JP, Bergeron J, Couture P, Bergeron N 2003 Variations in body composition and plasma lipids in response to a high-carbohydrate diet. *ObesRes* 11:978-986
243. Garg A, Grundy SM, Unger RH 1992 Comparison of effects of high and low carbohydrate diets on plasma lipoproteins and insulin sensitivity in patients with mild NIDDM. *Diabetes* 41:1278-1285
244. Chen YD, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM 1995 Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM? *Diabetes Care* 18:10-16
245. Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER, 3rd, Conlin PR, Erlinger TP, Rosner BA, Laranjo NM, Charleston J, McCarron P, Bishop LM 2005 Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *Jama* 294:2455-2464
246. Volek JS, Sharman MJ, Gomez AL, DiPasquale C, Roti M, Pumerantz A, Kraemer WJ 2004 Comparison of a very low-carbohydrate and low-fat diet on fasting lipids, LDL subclasses, insulin resistance, and postprandial lipemic responses in overweight women. *J Am Coll Nutr* 23:177-184
247. Krauss RM, Blanche PJ, Rawlings RS, Fernstrom HS, Williams PT 2006 Separate effects of reduced carbohydrate intake and weight loss on atherogenic dyslipidemia. *Am J Clin Nutr* 83:1025-1031; quiz 1205
248. Ballantyne CM, Olsson AG, Cook TJ, Mercuri MF, Pedersen TR, Kjekshus J 2001 Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. *Circulation* 104:3046-3051
249. Pyorala K, Ballantyne CM, Gumbiner B, Lee MW, Shah A, Davies MJ, Mitchell YB, Pedersen TR, Kjekshus J 2004 Reduction of cardiovascular events by simvastatin in nondiabetic coronary heart disease patients with and without the metabolic syndrome: subgroup analyses of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 27:1735-1740
250. Barter PJ, Rye KA 2008 Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:39-46

251. Rubins HB 2000 Triglycerides and coronary heart disease: implications of recent clinical trials. *J Cardiovasc Risk* 7:339-345
252. Vega GL, Ma PT, Cater NB, Filipchuk N, Meguro S, Garcia-Garcia AB, Grundy SM 2003 Effects of adding fenofibrate (200 mg/day) to simvastatin (10 mg/day) in patients with combined hyperlipidemia and metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 91:956-960
253. Ratner R, Goldberg R, Haffner S, Marcovina S, Orchard T, Fowler S, Temprosa M 2005 Impact of intensive lifestyle and metformin therapy on cardiovascular disease risk factors in the diabetes prevention program. *Diabetes Care* 28:888-894
254. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM 2002 The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51:2968-2974
255. Srikanthan P, Hsueh WA 2005 The role of thiazolidinediones in reversing insulin sensitivity and altering endothelial dysfunction. *Curr Diab Rep* 5:243-244, 245
256. Fonseca V 2003 Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 115 Suppl 8A:42S-48S
257. Sakai T, Kamanna VS, Kashyap ML 2001 Niacin, but not gemfibrozil, selectively increases LP-AI, a cardioprotective subfraction of HDL, in patients with low HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1783-1789
258. Grundy SM, Vega GL, McGovern ME, Tulloch BR, Kendall DM, Fitz-Patrick D, Ganda OP, Rosenson RS, Buse JB, Robertson DD, Sheehan JP 2002 Efficacy, safety, and tolerability of once-daily niacin for the treatment of dyslipidemia associated with type 2 diabetes: results of the assessment of diabetes control and evaluation of the efficacy of niaspan trial. *Arch Intern Med* 162:1568-1576
259. Garg A, Grundy SM 1990 Nicotinic acid as therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus [see comments]. *JAMA* 264:723-726
260. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ 2003 Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42:1206-1252

261. 1998 Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *Bmj* 317:703-713
262. Sowers JR 2004 Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597-1602
263. Scheen AJ 2004 Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs* 64:2537-2565
264. Moller DE 2001 New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414:821-827
265. Després JP, Golay A, Sjostrom L 2005 Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *NEnglJMed* 353:2121-2134
266. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A 2007 Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 370:1706-1713
267. Karathanasis SK 1985 Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6374-6378
268. Onat A, Hergenc G, Sansoy V, Fobker M, Ceyhan K, Toprak S, Assmann G 2003 Apolipoprotein C-III, a strong discriminant of coronary risk in men and a determinant of the metabolic syndrome in both genders. *Atherosclerosis* 168:81-89
269. Olivieri O, Bassi A, Stranieri C, Trabetti E, Martinelli N, Pizzolo F, Girelli D, Friso S, Pignatti PF, Corrocher R 2003 Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res* 44:2374-2381
270. Tilly P, Sass C, Vincent-Viry M, Aguilon D, Siest G, Visvikis S 2003 Biological and genetic determinants of serum apoC-III concentration: reference limits from the Stanislas Cohort. *J Lipid Res* 44:430-436
271. Mann CJ, Troussard AA, Yen FT, Hannouche N, Najib J, Fruchart JC, Lotteau V, Andre P, Bihain BE 1997 Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *J Biol Chem* 272:31348-31354

272. Barr SI, Kottke BA, Mao SJ 1981 Postprandial exchange of apolipoprotein C-III between plasma lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 34:191-198
273. Marcoux C, Tremblay M, Fredenrich A, Davignon J, Cohn JS 2001 Lipoprotein distribution of apolipoprotein C-III and its relationship to the presence in plasma of triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Metabolism* 50:112-119
274. Boyle KE, Phillips MC, Lund-Katz S 1999 Kinetics and mechanism of exchange of apolipoprotein C-III molecules from very low density lipoprotein particles. *Biochim Biophys Acta* 1430:302-312
275. Eisenberg S, Bilheimer DW, Levy RI 1972 The metabolism of very low density lipoprotein proteins. II. Studies on the transfer of apoproteins between plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 280:94-104
276. Berman M, Hall M, 3rd, Levy RI, Eisenberg S, Bilheimer DW, Phair RD, Goebel RH 1978 Metabolism of apoB and apoC lipoproteins in man: kinetic studies in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J Lipid Res* 19:38-56
277. Huff MW, Fidge NH, Nestel PJ, Billington T, Watson B 1981 Metabolism of C-apolipoproteins: kinetics of C-II, C-III1 and C-III2, and VLDL-apolipoprotein B in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *JLipid Res* 22:1235-1246
278. Bukberg PR, Le NA, Ginsberg HN, Gibson JC, Rubinstein A, Brown WV 1985 Evidence for non-equilibrating pools of apolipoprotein C-III in plasma lipoproteins. *JLipid Res* 26:1047-1057
279. Tornoci L, Scherardi CA, Li X, Ide H, Goldberg IJ, Le NA 1993 Abnormal activation of lipoprotein lipase by non-equilibrating apoC-II: further evidence for the presence of non-equilibrating pools of apolipoproteins C-II and C-III in plasma lipoproteins. *JLipid Res* 34:1793-1803
280. Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J, Steiner G 2004 Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *JClinEndocrinolMetab* 89:3949-3955

281. Nguyen MN, Chan DC, Dwyer KP, Bolitho P, Watts GF, Barrett PH 2006 Use of Intralipid for kinetic analysis of HDL apoC-III: evidence for a homogeneous kinetic pool of apoC-III in plasma. *J Lipid Res* 47:1274-1280
282. Ginsberg HN, Ramakrishnan R 2008 Kinetic studies of the metabolism of rapidly exchangeable apolipoproteins may leave investigators and readers with exchangeable results. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1685-1686
283. Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, Norum R, Brown WV 1986 Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest* 78:1287-1295
284. Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P 1985 Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 75:384-390
285. Catapano AL 1987 Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein C-II is modulated by the COOH terminal region of apolipoprotein C-III. *ChemPhysLipids* 45:39-47
286. Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS 1997 Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J Clin Invest* 99:2672-2681
287. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC 1995 Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:963-971
288. Gervaise N, Garrigue MA, Lasfargues G, Lecomte P 2000 Triglycerides, apo C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in type II diabetes. *Diabetologia* 43:703-708
289. Forte TM, Nichols AV, Krauss RM, Norum RA 1984 Familial apolipoprotein AI and apolipoprotein CIII deficiency. Subclass distribution, composition, and morphology of lipoproteins in a disorder associated with premature atherosclerosis. *J Clin Invest* 74:1601-1613

290. von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G 1991 Apolipoprotein C-III(Lys58----Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 87:1724-1731
291. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL 1990 Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 249:790-793
292. Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J 1994 Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 269:23610-23616
293. Takahashi T, Hirano T, Okada K, Adachi M 2003 Apolipoprotein CIII deficiency prevents the development of hypertriglyceridemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Metabolism* 52:1354-1359
294. Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ 2005 Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes* 54:664-671
295. Nishida HI, Nakanishi T, Yen EA, Arai H, Yen FT, Nishida T 1986 Nature of the enhancement of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction by various apolipoproteins. *J Biol Chem* 261:12028-12035
296. Dobiasova M, Frohlich JJ 1999 Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clin Chim Acta* 286:257-271
297. Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF 2008 Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)* 114:611-624
298. Blankenhorn DH, Alaupovic P, Wickham E, Chin HP, Azen SP 1990 Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts. Lipid and nonlipid factors. *Circulation* 81:470-476
299. Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Alaupovic P, Pogoda JM, LaBree L, Hemphill LC, Krams DM, Blankenhorn DH 1994 Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation* 90:42-49

300. Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA, Braunwald E 2000 VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation* 102:1886-1892
301. Scheffer PG, Teerlink T, Dekker JM, Bos G, Nijpels G, Diamant M, Kostense PJ, Stehouwer CD, Heine RJ 2008 Increased plasma apolipoprotein C-III concentration independently predicts cardiovascular mortality: the Hoorn Study. *Clin Chem* 54:1325-1330
302. Lee SJ, Campos H, Moye LA, Sacks FM 2003 LDL containing apolipoprotein CIII is an independent risk factor for coronary events in diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:853-858
303. Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T 1995 Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 96:2601-2605
304. Chen M, Breslow JL, Li W, Leff T 1994 Transcriptional regulation of the apoC-III gene by insulin in diabetic mice: correlation with changes in plasma triglyceride levels. *J Lipid Res* 35:1918-1924
305. Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J 1995 Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest* 95:705-712
306. Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J 1996 Hypolipidemic effect of peroxisome proliferators. Transcriptional suppression of apolipoprotein C-III. *Ann N Y Acad Sci* 804:731-733
307. Zhong S, Goldberg IJ, Bruce C, Rubin E, Breslow JL, Tall A 1994 Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J Clin Invest* 94:2457-2467

308. Nanjee MN, Doran JE, Lerch PG, Miller NE 1999 Acute effects of intravenous infusion of ApoA1/phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:979-989
309. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM 1999 Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *ArteriosclerThrombVascBiol* 19:472-484
310. Roghani A, Zannis VI 1988 Mutagenesis of the glycosylation site of human ApoCIII. O-linked glycosylation is not required for ApoCIII secretion and lipid binding. *J Biol Chem* 263:17925-17932
311. Ghiselli G, Beigel Y, Soma M, Gotto AM, Jr. 1986 Plasma catabolism of human apolipoprotein E isoproteins: lack of conversion of the doubly sialylated form to the asialo form in plasma. *Metabolism* 35:399-403
312. Schauer R, Veh RW, Wember M 1976 Demonstration of neuraminidase activity in human blood serum and human milk using a modified, radioactively labelled alpha 1-glycoprotein as substrate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357:559-566
313. Stoline AM, Saku K, Hynd BA, Kashyap ML 1985 Effect of desialylation of very low-density lipoproteins on their catabolism by lipoprotein lipase. *Metabolism* 34:30-35
314. Stocks J, Holdsworth G, Galton D 1979 Hypertriglyceridaemia associated with an abnormal triglyceride-rich lipoprotein carrying excess apolipoprotein C-III-2. *Lancet* 2:667-671
315. Holdsworth G, Stocks J, Dodson P, Galton DJ 1982 An abnormal triglyceride-rich lipoprotein containing excess sialylated apolipoprotein C-III. *JClinInvest* 69:932-939
316. Vance DEV, J.E. 2002 *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th Ed.: Elsevier
317. Karpe F, Hamsten A, Uffelman K, Steiner G 1996 Apolipoprotein B-48. *Methods Enzymol* 263:95-104
318. Redgrave TG 1977 Catabolism of chylomicron triacylglycerol and cholesteryl ester in genetically obese rats. *J Lipid Res* 18:604-612

319. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH 1984 Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25:1277-1294
320. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD 2000 The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest* 105:521-532
321. Chisolm GM, Steinberg D 2000 The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28:1815-1826
322. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ 1995 Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488-2496
323. Williams KJ, Tabas I 1998 The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 9:471-474
324. Williams KJ, Tabas I 1995 The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:551-561
325. Brown MS, Goldstein JL 1983 Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52:223-261
326. Katz SS, Shipley GG, Small DM 1976 Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between fatty streaks and advanced plaques. *J Clin Invest* 58:200-211
327. Packard CJ, Shepherd J 1997 Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3542-3556
328. Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, Keyes MJ, Schaefer EJ, Wilson PW, D'Agostino RB, Vasan RS, Robins SJ 2006 Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. *Circulation* 113:20-29
329. Reaven GM, Chen YD, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM 1993 Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J Clin Invest* 92:141-146
330. Lamarche B, Lemieux I, Després JP 1999 The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab* 25:199-211

331. Tan KC, Cooper MB, Ling KL, Griffin BA, Freeman DJ, Packard CJ, Shepherd J, Hales CN, Betteridge DJ 1995 Fasting and postprandial determinants for the occurrence of small dense LDL species in non-insulin-dependent diabetic patients with and without hypertriglyceridaemia: the involvement of insulin, insulin precursor species and insulin resistance. *Atherosclerosis* 113:273-287
332. Feingold KR, Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Krauss RM 1992 LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Arterioscler Thromb* 12:1496-1502
333. Selby JV, Austin MA, Newman B, Zhang D, Quesenberry CP, Jr., Mayer EJ, Krauss RM 1993 LDL subclass phenotypes and the insulin resistance syndrome in women. *Circulation* 88:381-387
334. Campos H, Genest JJ, Jr., Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ 1992 Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 12:187-195
335. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J 1994 Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: Relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 106:241-253
336. Swinkels DW, Demacker PN, Hendriks JC, van 't Laar A 1989 Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals. *Arteriosclerosis* 9:604-613
337. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM 1988 Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 260:1917-1921
338. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Després JP, Lamarche B 2001 Comparison of Various Electrophoretic Characteristics of LDL Particles and Their Relationship to the Risk of Ischemic Heart Disease. *Circulation* 104:2295-2299
339. Koba S, Hirano T, Ito Y, Tsunoda F, Yokota Y, Ban Y, Iso Y, Suzuki H, Katagiri T 2006 Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in relation to the severity of coronary heart diseases. *Atherosclerosis* 189:206-214

340. Inukai T, Yamamoto R, Suetsugu M, Matsumoto S, Wakabayashi S, Inukai Y, Matsutomo R, Takebayashi K, Aso Y 2005 Small low-density lipoprotein and small low-density lipoprotein/total low-density lipoprotein are closely associated with intima-media thickness of the carotid artery in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 19:269-275
341. Sniderman AD 1988 Apolipoprotein B and apolipoprotein AI as predictors of coronary artery disease. *Can J Cardiol*
342. Sacks FM, Campos H 2003 Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4525-4532
343. Berneis K, Rizzo M 2004 LDL size: does it matter? *SwissMedWkly* 134:720-724
344. Packard CJ 2006 Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 17:412-417
345. Galeano NF, Al Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ 1998 Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *JLipid Res* 39:1263-1273
346. Campos H, Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM 1996 Differences in receptor binding of LDL subfractions. *ArteriosclerThrombVascBiol* 16:794-801
347. Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM 2001 Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *AmJMed* 110:103-110
348. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM 1992 Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 93:189-199
349. Campos H, Walsh BW, Judge H, Sacks FM 1997 Effect of estrogen on very low density lipoprotein and low density lipoprotein subclass metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3955-3963
350. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ, Schwertfeger G, Bedynek A, Shepherd J, Seidel D 2000 Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res* 41:305-318

351. Teng B, Sniderman AD, Soutar AK, Thompson GR 1986 Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apolipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 77:663-672
352. Lagrost L, Gambert P, Lallemand C 1994 Combined effects of lipid transfers and lipolysis on gradient gel patterns of human plasma LDL. *Arterioscler Thromb* 14:1327-1336
353. Nicoll A, Lewis B 1980 Evaluation of the roles of lipoprotein lipase and hepatic lipase in lipoprotein metabolism: in vivo and in vitro studies in man. *Eur J Clin Invest* 10:487-495
354. Deckelbaum RJ, Ramakrishnan R, Eisenberg S, Olivecrona T, Bengtsson Olivecrona G 1992 Triacylglycerol and phospholipid hydrolysis in human plasma lipoproteins: role of lipoprotein and hepatic lipase. *Biochemistry* 31:8544-8551
355. Thuren T, Wilcox RW, Sisson P, Waite M 1991 Hepatic lipase hydrolysis of lipid monolayers. Regulation by apolipoproteins. *J Biol Chem* 266:4853-4861
356. Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV 1991 Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 87:1259-1265
357. Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV 1991 Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 21:161-167
358. Zambon A, Austin MA, Brown BG, Hokanson JE, Brunzell JD 1993 Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 13:147-153
359. Deckelbaum RJ, Hamilton JA, Moser A, Bengtsson Olivecrona G, Butbul E, Carpentier YA, Gutman A, Olivecrona T 1990 Medium-chain versus long-chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: implications for the mechanisms of lipase action. *Biochemistry* 29:1136-1142
360. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ 1992 Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb* 12:1284-1290

361. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM 1990 Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 82:495-506
362. Berneis KK, Krauss RM 2002 Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *JLipid Res* 43:1363-1379
363. Krauss RM, Williams PT, Lindgren FT, Wood PD 1988 Coordinate changes in levels of human serum low and high density lipoprotein subclasses in healthy men. *Arteriosclerosis* 8:155-162
364. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA, Smith CW 1991 Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *Faseb J* 5:2529-2537
365. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE 1997 C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 95:97-103
366. Libby P 2002 Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874
367. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT 1996 Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 7:330-335
368. George SJ 1998 Tissue inhibitors of metalloproteinases and metalloproteinases in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9:413-423
369. Holvoet P, Collen D 1997 Thrombosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8:320-328
370. Pepys MB, Baltz ML 1983 Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 34:141-212
371. Volanakis JE 1982 Complement-induced solubilization of C-reactive protein-pneumococcal C-polysaccharide precipitates: evidence for covalent binding of complement proteins to C-reactive protein and to pneumococcal C-polysaccharide. *J Immunol* 128:2745-2750

372. Kinoshita CM, Ying SC, Hugli TE, Siegel JN, Potempa LA, Jiang H, Houghten RA, Gewurz H 1989 Elucidation of a protease-sensitive site involved in the binding of calcium to C-reactive protein. *Biochemistry* 28:9840-9848
373. Volanakis JE, Kaplan MH 1971 Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* 136:612-614
374. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL 2002 C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13043-13048
375. Bhakdi S, Torzewski M, Paprotka K, Schmitt S, Barsoom H, Suriyaphol P, Han SR, Lackner KJ, Husmann M 2004 Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation* 109:1870-1876
376. Hart SP, Alexander KM, MacCall SM, Dransfield I 2005 C-reactive protein does not opsonize early apoptotic human neutrophils, but binds only membrane-permeable late apoptotic cells and has no effect on their phagocytosis by macrophages. *J Inflamm (Lond)* 2:5
377. Pepys MB, Booth SE, Tennent GA, Butler PJ, Williams DG 1994 Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin Exp Immunol* 97:152-157
378. Volanakis JE 1982 Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci* 389:235-250
379. Baltz ML, de Beer FC, Feinstein A, Munn EA, Milstein CP, Fletcher TC, March JF, Taylor J, Bruton C, Clamp JR, Davies AJ, Pepys MB 1982 Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Ann N Y Acad Sci* 389:49-75
380. Pepys MB, Dash AC, Fletcher TC, Richardson N, Munn EA, Feinstein A 1978 Analogues in other mammals and in fish of human plasma proteins, C-reactive protein and amyloid P component. *Nature* 273:168-170

381. Casas JP, Shah T, Hingorani AD, Danesh J, Pepys MB 2008 C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med* 264:295-314
382. Hutchinson WL, Koenig W, Frohlich M, Sund M, Lowe GD, Pepys MB 2000 Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin Chem* 46:934-938
383. Lakoski SG, Cushman M, Criqui M, Rundek T, Blumenthal RS, D'Agostino RB, Jr., Herrington DM 2006 Gender and C-reactive protein: data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort. *Am Heart J* 152:593-598
384. Shine B, de Beer FC, Pepys MB 1981 Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. *Clin Chim Acta* 117:13-23
385. Woloshin S, Schwartz LM 2005 Distribution of C-reactive protein values in the United States. *N Engl J Med* 352:1611-1613
386. Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J 2005 C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *Am J Pathol* 167:1139-1148
387. Hutchinson WL, Noble GE, Hawkins PN, Pepys MB 1994 The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo. *J Clin Invest* 94:1390-1396
388. Ganapathi MK, May LT, Schultz D, Brabenec A, Weinstein J, Sehgal PB, Kushner I 1988 Role of interleukin-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 157:271-277
389. Ganter U, Arcone R, Toniatti C, Morrone G, Ciliberto G 1989 Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *Embo J* 8:3773-3779
390. Choi YS, Hur J, Jeong S 2007 Beta-catenin binds to the downstream region and regulates the expression C-reactive protein gene. *Nucleic Acids Res* 35:5511-5519
391. Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, Mach F 2005 Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new

- evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1231-1236
392. Pepys MB 2005 CRP or not CRP? That is the question. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1091-1094
393. Kushner I, Rzewnicki D, Samols D 2006 What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 119:166 e117-128
394. Reynolds GD, Vance RP 1987 C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch Pathol Lab Med* 111:265-269
395. de Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB 1982 Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 47:239-243
396. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC 1995 Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 332:635-641
397. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB 1997 Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 349:462-466
398. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, Rumley A, Lowe GD 2000 Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 343:1148-1155
399. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR 2002 Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347:1557-1565
400. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN 1996 Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am JEpidemiol* 144:537-547

401. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM, Jr. 2001 Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 344:1959-1965
402. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH 1997 Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336:973-979
403. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB 1999 C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99:237-242
404. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V 2004 C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-1397
405. Ridker PM 2003 Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 107:363-369
406. Zacho JT-H, A.; Jensen, J.S.; Grande, P.; Sillesen, H.; Nordestgaard, B.G. 2008 Genetically Elevated C-Reactive Protein and Ischemic Vascular Disease. *N Engl J Med* 359:1897-1908
407. Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G 2001 C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1416-1420
408. Romano M, Guagnano MT, Pacini G, Vigneri S, Falco A, Marinopicolli M, Manigrasso MR, Basili S, Davi G 2003 Association of inflammation markers with impaired insulin sensitivity and coagulative activation in obese healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5321-5326
409. Ford ES 1999 Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 22:1971-1977
410. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB 1999 Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Jama* 282:2131-2135

411. Jonkers IJ, Mohrschladt MF, Westendorp RG, van der Laarse A, Smelt AH 2002 Severe hypertriglyceridemia with insulin resistance is associated with systemic inflammation: reversal with bezafibrate therapy in a randomized controlled trial. *Am J Med* 112:275-280
412. Frohlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, Muche R, Brenner H, Koenig W 2000 Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 23:1835-1839
413. Tamakoshi K, Yatsuya H, Kondo T, Hori Y, Ishikawa M, Zhang H, Murata C, Otsuka R, Zhu S, Toyoshima H 2003 The metabolic syndrome is associated with elevated circulating C-reactive protein in healthy reference range, a systemic low-grade inflammatory state. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:443-449
414. Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM 2000 Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102:42-47
415. Temelkova-Kurktschiev T, Siegert G, Bergmann S, Henkel E, Koehler C, Jaross W, Hanefeld M 2002 Subclinical inflammation is strongly related to insulin resistance but not to impaired insulin secretion in a high risk population for diabetes. *Metabolism* 51:743-749
416. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Liang L, Reaven G, Schaaf P, Reaven P 2002 Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. *Circulation* 106:2908-2912
417. Arnalich F, Hernanz A, Lopez-Maderuelo D, Pena JM, Camacho J, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C 2000 Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Horm Metab Res* 32:407-412
418. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N 2003 C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107:391-397
419. Greenfield JR, Samaras K, Jenkins AB, Kelly PJ, Spector TD, Gallimore JR, Pepys MB, Campbell LV 2004 Obesity is an important determinant of baseline serum C-reactive protein concentration in monozygotic twins, independent of genetic influences. *Circulation* 109:3022-3028

420. Kahn SE, Zinman B, Haffner SM, O'Neill MC, Kravitz BG, Yu D, Freed MI, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Lachin JM, Viberti GC 2006 Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes* 55:2357-2364
421. Brinkworth GD, Noakes M, Keogh JB, Luscombe ND, Wittert GA, Clifton PM 2004 Long-term effects of a high-protein, low-carbohydrate diet on weight control and cardiovascular risk markers in obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:661-670
422. Pereira MA, Swain J, Goldfine AB, Rifai N, Ludwig DS 2004 Effects of a low-glycemic load diet on resting energy expenditure and heart disease risk factors during weight loss. *Jama* 292:2482-2490
423. Haffner S, Temprosa M, Crandall J, Fowler S, Goldberg R, Horton E, Marcovina S, Mather K, Orchard T, Ratner R, Barrett-Connor E 2005 Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 54:1566-1572
424. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM 2001 C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334
425. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N 2002 C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 51:1596-1600
426. Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP 2001 The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes* 50:2384-2389
427. Thorand B, Lowel H, Schneider A, Kolb H, Meisinger C, Frohlich M, Koenig W 2003 C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998. *Arch Intern Med* 163:93-99
428. Festa A, D'Agostino R, Jr., Tracy RP, Haffner SM 2002 Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 51:1131-1137

429. Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE 2004 Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes* 53:693-700
430. Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM 2004 Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation* 109:2818-2825
431. van den Berg CW, Taylor KE, Lang D 2004 C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:e168-171
432. Lafuente N, Azcutia V, Matesanz N, Cercas E, Rodriguez-Manas L, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C 2005 Evidence for sodium azide as an artifact mediating the modulation of inducible nitric oxide synthase by C-reactive protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:193-196
433. Pepys MB, Hawkins PN, Kahan MC, Tennent GA, Gallimore JR, Graham D, Sabin CA, Zychlinsky A, de Diego J 2005 Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. *CircRes* 97:e97-103
434. Swafford AN, Jr., Bratz IN, Knudson JD, Rogers PA, Timmerman JM, Tune JD, Dick GM 2005 C-reactive protein does not relax vascular smooth muscle: effects mediated by sodium azide in commercially available preparations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1786-1795
435. Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW 2005 C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1225-1230
436. de Beer FC, Baltz ML, Munn EA, Feinstein A, Taylor J, Bruton C, Clamp JR, Pepys MB 1982 Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology* 45:55-70
437. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, Pepys MB 1999 C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 190:1733-1740

438. Verma S, Devaraj S, Jialal I 2006 Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 113:2135-2150; discussion 2150
439. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET 2000 Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102:2165-2168
440. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET 2001 Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 103:2531-2534
441. Mineo C, Gormley AK, Yuhanna IS, Osborne-Lawrence S, Gibson LL, Hahner L, Shohet RV, Black S, Salmon JE, Samols D, Karp DR, Thomas GD, Shaul PW 2005 FcγRIIB mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase. *Circ Res* 97:1124-1131
442. Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW 2005 C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:995-1001
443. Paffen E, Vos HL, Bertina RM 2004 C-reactive protein does not directly induce tissue factor in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:975-981
444. Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodriguez JA, Diez J, Libby P, Paramo JA 2006 C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47:1369-1378
445. Doronzo G, Russo I, Mattiello L, Trovati M, Anfossi G 2005 C-reactive protein increases matrix metalloproteinase-2 expression and activity in cultured human vascular smooth muscle cells. *J Lab Clin Med* 146:287-298
446. Scirica BM, Morrow DA 2006 Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 113:2128-2134; discussion 2151
447. Barrett PH, Chan DC, Watts GF 2006 Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res* 47:1607-1619
448. Waterlow J 2006 *Protein Turnover*. CAB international ed. Cambridge, MA

449. Wolfe RC, DL 2005 Isotope tracers in metabolic research : principles and practice of kinetic analysis. Hoboken, NJ: John Wiley and sons
450. Schoenheimer R, Rittenberg D 1935 Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. *J Biol Chem* 111:163-192
451. Schoenheimer R, Rutner S, Rittenberg D 1935 Studies in protein metabolism: metabolic activity of body proteins investigated with L-leucine containing two isotopes. *J Biol Chem* 130:730-732
452. Marsh JB, Welty FK, Lichtenstein AH, Lamon-Fava S, Schaefer EJ 2002 Apolipoprotein B metabolism in humans: studies with stable isotope-labeled amino acid precursors. *Atherosclerosis* 162:227-244
453. McFarlane A 1958 Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182:53
454. Ramakrishnan R, Arad Y, Wong S, Ginsberg HN 1990 Nonuniform radiolabeling of VLDL apolipoprotein B: implications for the analysis of studies of the kinetics of the metabolism of lipoproteins containing apolipoprotein B. *J Lipid Res* 31:1031-1042
455. Patterson BW, Lee AM 1986 Self-association and phospholipid binding properties of iodinated apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 25:4953-4957
456. Lichtenstein AH, Cohn JS, Hachey DL, Millar JS, Ordovas JM, Schaefer EJ 1990 Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics. *J Lipid Res* 31:1693-1701
457. Foster DM, Barrett PH, Toffolo G, Beltz WF, Cobelli C 1993 Estimating the fractional synthetic rate of plasma apolipoproteins and lipids from stable isotope data. *J Lipid Res* 34:2193-2205
458. Patterson BW, Hachey DL, Cook GL, Amann JM, Klein PD 1991 Incorporation of a stable isotopically labeled amino acid into multiple human apolipoproteins. *J Lipid Res* 32:1063-1072
459. Cohn JS, Wagner DA, Cohn SD, Millar JS, Schaefer EJ 1990 Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (Apo) B-100 and high density lipoprotein Apo A-I production in human subjects using deuterated leucine. Effect of fasting and feeding. *J Clin Invest* 85:804-811

460. Ramakrishnan R 2006 Studying apolipoprotein turnover with stable isotope tracers: correct analysis is by modeling enrichments. *JLipid Res* 47:2738-2753
461. Demant T, Packard CJ, Demmelmair H, Stewart P, Bedynek A, Bedford D, Seidel D, Shepherd J 1996 Sensitive methods to study human apolipoprotein B metabolism using stable isotope-labeled amino acids. *Am J Physiol* 270:E1022-1036
462. Halliday D, Venkatesan S, Pacy P 1993 Apolipoprotein metabolism: a stable-isotope approach. *Am J Clin Nutr* 57:726S-730S; discussion 730S-731S
463. Bennet WM, O'Keefe SJ, Haymond MW 1993 Comparison of precursor pools with leucine, alpha-ketoisocaproate, and phenylalanine tracers used to measure splanchnic protein synthesis in man. *Metabolism* 42:691-695
464. Chan DC, Barrett PH, Watts GF 2004 Lipoprotein transport in the metabolic syndrome: methodological aspects of stable isotope kinetic studies. *ClinSci(Lond)* 107:221-232
465. Magot T 1990 La modélisation des métabolismes : application au métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines plasmatiques
Paris: Masson
466. Berman MG, S.M.; Howard, B.V. 1982 Lipoprotein kinetic and modeling. New York: Academic Press
467. Barrett PH, Bell BM, Cobelli C, Golde H, Schumitzky A, Vicini P, Foster DM 1998 SAAM II: Simulation, Analysis, and Modeling Software for tracer and pharmacokinetic studies. *Metabolism* 47:484-492
468. Cobelli C, Foster DM 1998 Compartmental models: theory and practice using the SAAM II software system. *Adv Exp Med Biol* 445:79-101
469. Tremblay AJ, Lamarche B, Ruel IL, Hogue JC, Bergeron J, Gagne C, Couture P 2004 Increased production of VLDL apoB-100 in subjects with familial hypercholesterolemia carrying the same null LDL receptor gene mutation. *JLipid Res* 45:866-872
470. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Rodriguez C, Steiner G, Mamer O, Davignon J 2004 Increased apoC-III production is a characteristic feature of patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 177:137-145

471. Desroches S, Ruel IL, Deshaies Y, Paradis ME, Archer WR, Couture P, Bergeron N, Lamarche B 2008 Kinetics of plasma apolipoprotein C-III as a determinant of diet-induced changes in plasma triglyceride levels. *Eur J Clin Nutr* 62:10-17
472. Dinkel RE, Barrett PH, Demant T, Parhofer KG 2006 In-vivo metabolism of VLDL-apolipoprotein-B, -CIII and -E in normolipidemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16:215-221
473. Chan DC, Nguyen MN, Watts GF, Barrett PH 2008 Plasma apolipoprotein C-III transport in centrally obese men: associations with very low-density lipoprotein apolipoprotein B and high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 93:557-564
474. Huff MW, Nestel PJ 1982 Metabolism of apolipoproteins CII, CIII1, CIII2 and VLDL-B in human subjects consuming high carbohydrate diets. *Metabolism* 31:493-498
475. Malmendier CL, Lontie JF, Delcroix C, Dubois DY, Magot T, De Roy L 1989 Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. *Atherosclerosis* 77:139-149
476. Batal R, Tremblay M, Barrett PH, Jacques H, Fredenrich A, Mamer O, Davignon J, Cohn JS 2000 Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *JLipid Res* 41:706-718
477. Chan DC, Watts GF, Ooi EM, Ji J, Johnson AG, Barrett PH 2008 Atorvastatin and fenofibrate have comparable effects on VLDL-apolipoprotein C-III kinetics in men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1831-1837
478. Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Chen MM, Nestel PJ, Sviridov D, Barrett PH 2008 Dose-dependent effect of rosuvastatin on VLDL-apolipoprotein C-III kinetics in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 31:1656-1661
479. Malmendier CL, Delcroix C 1985 Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 55:161-169

480. Gitlin D, Cornwell DG, Nakasato D, Oncley JL, Hughes WL, Jr., Janeway CA 1958 Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. II. The lipoproteins. *J Clin Invest* 37:172-184
481. Cryer DR, Matsushima T, Marsh JB, Yudkoff M, Coates PM, Cortner JA 1986 Direct measurement of apolipoprotein B synthesis in human very low density lipoprotein using stable isotopes and mass spectrometry. *J Lipid Res* 27:508-516
482. Millar JS, Packard CJ 1998 Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr Opin Lipidol* 9:197-202
483. Ginsberg HN, Le NA, Gibson JC 1985 Regulation of the production and catabolism of plasma low density lipoproteins in hypertriglyceridemic subjects. Effect of weight loss. *J Clin Invest* 75:614-623
484. Packard CJ, Gaw A, Demant T, Shepherd J 1995 Development and application of a multicompartmental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism. *J Lipid Res* 36:172-187
485. Parhofer KG, Barrett PH 2006 Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res* 47:1620-1630
486. Shames DM, Havel RJ 1991 De novo production of low density lipoproteins: fact or fancy. *J Lipid Res* 32:1099-1112
487. Ginsberg HN, Stalenhoef AF 2003 The metabolic syndrome: targeting dyslipidaemia to reduce coronary risk. *J Cardiovasc Risk* 10:121-128
488. Kissebah AH, Alfarsi S, Adams PW 1981 Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in man: normolipemic subjects, familial hypertriglyceridemia and familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 30:856-868
489. Egusa G, Beltz WF, Grundy SM, Howard BV 1985 Influence of obesity on the metabolism of apolipoprotein B in humans. *J Clin Invest* 76:596-603
490. Chait A, Albers JJ, Brunzell JD 1980 Very low density lipoprotein overproduction in genetic forms of hypertriglyceridaemia. *Eur J Clin Invest* 10:17-22

491. Cummings MH, Watts GF, Pal C, Umpleby M, Hennessy TR, Naoumova R, Sonksen PH 1995 Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in obesity: a stable isotope study. *Clin Sci (Lond)* 88:225-233
492. Cummings MH, Watts GF, Umpleby AM, Hennessy TR, Naoumova R, Slavin BM, Thompson GR, Sonksen PH 1995 Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetologia* 38:959-967
493. Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P 2007 Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J Lipid Res* 48:1336-1342
494. Gill JM, Brown JC, Bedford D, Wright DM, Cooney J, Hughes DA, Packard CJ, Caslake MJ 2004 Hepatic production of VLDL1 but not VLDL2 is related to insulin resistance in normoglycaemic middle-aged subjects. *Atherosclerosis* 176:49-56
495. Ouguerram K, Magot T, Zair Y, Marchini JS, Charbonnel B, Laouenan H, Krempf M 2003 Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 306:332-337
496. Riches FM, Watts GF, Hua J, Stewart GR, Naoumova RP, Barrett PH 1999 Reduction in visceral adipose tissue is associated with improvement in apolipoprotein B-100 metabolism in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2854-2861
497. Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Beilin LJ, Redgrave TG, Mori TA 2002 Regulatory effects of HMG CoA reductase inhibitor and fish oils on apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese male subjects with dyslipidemia. *Diabetes* 51:2377-2386
498. Nestel PJ, Connor WE, Reardon MF, Connor S, Wong S, Boston R 1984 Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J Clin Invest* 74:82-89
499. Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Mori TA, Beilin LJ, Redgrave TG 2002 Mechanism of action of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor on apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2283-2289

500. Bilz S, Wagner S, Schmitz M, Bedynek A, Keller U, Demant T 2004 Effects of atorvastatin versus fenofibrate on apoB-100 and apoA-I kinetics in mixed hyperlipidemia. *J Lipid Res* 45:174-185
501. Forster LF, Stewart G, Bedford D, Stewart JP, Rogers E, Shepherd J, Packard CJ, Caslake MJ 2002 Influence of atorvastatin and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in moderate combined hyperlipidemic subjects with low VLDL and LDL fractional clearance rates. *Atherosclerosis* 164:129-145
502. Watts GF, Barrett PH, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD, Loehrer F, Johnson AG 2003 Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes* 52:803-811
503. Hogue JC, Lamarche B, Deshaies Y, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P 2008 Differential effect of fenofibrate and atorvastatin on in vivo kinetics of apolipoproteins B-100 and B-48 in subjects with type 2 diabetes mellitus with marked hypertriglyceridemia. *Metabolism* 57:246-254
504. Myerson M, Ngai C, Jones J, Holleran S, Ramakrishnan R, Berglund L, Ginsberg HN 2005 Treatment with high-dose simvastatin reduces secretion of apolipoprotein B-lipoproteins in patients with diabetic dyslipidemia. *J Lipid Res* 46:2735-2744
505. Nagashima K, Lopez C, Donovan D, Ngai C, Fontanez N, Bensadoun A, Fruchart-Najib J, Holleran S, Cohn JS, Ramakrishnan R, Ginsberg HN 2005 Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 115:1323-1332
506. Bilz S, Wagner S, Schmitz M, Bedynek A, Keller U, Demant T 2004 Effects of atorvastatin versus fenofibrate on apoB-100 and apoA-I kinetics in mixed hyperlipidemia. *JLipid Res* 45:174-185
507. Griffin BA 1995 Low-density lipoprotein heterogeneity. *Bailliere Clin Endocrinol Met* 9:687-703
508. Yamane K, Kataoka S, Le NA, Paidi M, Howard WJ, Hannah JS, Howard BV 1996 Binding affinity and particle size of LDL in subjects with moderate hypercholesterolemia: relationship with in vivo LDL metabolism. *J Lipid Res* 37:1646-1654

509. Fisher WR, Zech LA, Bardalaye P, Warmke G, Berman M 1980 The metabolism of apolipoprotein B in subjects with hypertriglyceridemia and polydisperse LDL. *J Lipid Res* 21:760-774
510. Fisher WR, Zech LA, Kilgore LL, Stacpoole PW 1991 Metabolic pathways of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia: studies with a [³H]leucine tracer. *J Lipid Res* 32:1823-1836
511. Marzetta CA, Foster DM, Brunzell JD 1990 Conversion of plasma VLDL and IDL precursors into various LDL subpopulations using density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res* 31:975-984
512. Baltz ML, Rowe IF, Pepys MB 1985 In vivo turnover studies of C-reactive protein. *Clin Exp Immunol* 59:243-250
513. Motie M, Schaul KW, Potempa LA 1998 Biodistribution and clearance of ¹²⁵I-labeled C-reactive protein and ¹²⁵I-labeled modified C-reactive protein in CD-1 mice. *Drug Metab Dispos* 26:977-981
514. Chelladurai M, Macintyre SS, Kushner I 1983 In vivo studies of serum C-reactive protein turnover in rabbits. *J Clin Invest* 71:604-610
515. Rowe IF, Baltz ML, Soutar AK, Pepys MB 1984 In vivo turnover studies of C-reactive protein and lipoproteins in the rabbit. *Clin Exp Immunol* 58:245-252
516. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN 1993 Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 91:1351-1357
517. Krauss RM 1994 Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol* 5:339-349
518. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K 2006 Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 368:1-19