



Étude comparative des déterminants métaboliques de la taille et du nombre de particules LDL chez l'homme et la femme

Mémoire

Myriam Leclerc

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

Québec, Canada

© Myriam Leclerc, 2016

Étude comparative des déterminants métaboliques de la taille et du nombre de particules LDL chez l'homme et la femme

Mémoire

Myriam Leclerc

Sous la direction de :

Benoît Lamarche, directeur de recherche
Patrick Couture, codirecteur de recherche

Résumé

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent une des principales causes de décès dans le monde. La diminution des concentrations de cholestérol contenues dans les LDL (LDL) représente actuellement la méthode de prévention privilégiée dans la prévention des MCV. Toutefois, d'autres biomarqueurs, telles que la concentration d'apolipoprotéine (apo) B-100 et la taille des LDL, pourraient être utilisés et seraient possiblement supérieurs dans l'évaluation du risque. Ainsi, puisque la mesure du cholestérol LDL (LDL-C), habituellement utilisée en clinique, ne permet pas nécessairement de d'obtenir autant d'informations que ces deux derniers marqueurs, il importe d'en déterminer les facteurs métaboliques responsables, et ce, dans le but d'établir une stratégie de prévention efficace. Ce mémoire présente les résultats d'une étude d'observation dont l'objectif était de comparer les origines métaboliques de ces deux marqueurs athérogènes. Les résultats suggèrent que les phénotypes de la taille et du nombre de particules LDL naissent d'origines métaboliques distinctes.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) represent one of the leading mortality causes in the world. Reduction of the concentration of cholesterol in low-density-lipoprotein (LDL) is currently the privileged CVD prevention method. However, others markers such as apolipoprotein (apo) B-100 and LDL size might be more accurate in CVD risk prediction because they reflect additional features of cardiometabolic risk that are not provided by the traditional LDL-C measures in clinic. It is therefore of great interest to better understand the metabolic factors responsible for increased LDL particle number and decreased LDL particle size, in the optics of establishing an efficient prevention strategy. This thesis presents the results of an observational study, which has the objective of comparing the metabolic origins of high levels of apo-B100 and of small LDL particle size. Results suggest that both features are the result of distinct metabolic pathways.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé | III |
| Abstract..... | IV |
| Table des matières | V |
| Liste des tableaux | VII |
| Liste des figures et illustrations..... | VIII |
| Liste des abréviations et sigles | IX |
| Avant-propos | X |
| Chapitre 1. Introduction générale | 1 |
| Chapitre 2. Problématique | 3 |
| 2.1 Athérosclérose et MCV | 4 |
| 2.1.1 Développement de l'athérosclérose..... | 4 |
| 2.1.2 Facteurs de risque conventionnels des MCV..... | 5 |
| 2.1.3 Facteurs de risque non conventionnels des MCV..... | 6 |
| 2.1.4 Méthode actuelle d'évaluation du risque..... | 7 |
| Chapitre 3. Les lipoprotéines..... | 8 |
| 3.1 Le métabolisme des lipoprotéines..... | 8 |
| 3.1.1 Les différentes lipoprotéines | 8 |
| 3.1.2 Structure des lipoprotéines | 9 |
| 3.1.3 Métabolisme des lipoprotéines : un survol..... | 10 |
| 3.1.4 Déterminants des niveaux de LDL-cholestérol..... | 12 |
| Chapitre 4. Étude du métabolisme lipidique..... | 14 |
| 4.1 Études de cinétique..... | 14 |
| 4.1.1 Marquage à l'aide d'isotopes stables | 15 |
| 4.1.2 Modélisation et application au métabolisme des lipoprotéines | 15 |
| Chapitre 5. Hétérogénéité des particules LDL et MCV | 18 |
| 5.1 Déterminants de la taille des particules LDL | 20 |
| Chapitre 6. Nombre de particules LDL et MCV | 22 |
| 6.1 Déterminants du nombre de particules LDL..... | 23 |
| Chapitre 7. Mise en contexte des différents projets de cinétique | 24 |
| 7.1 Méthodologie..... | 24 |
| 7.1.1 Sujets..... | 24 |
| 7.1.2 Protocoles de cinétiques..... | 24 |
| 7.2 Objectif et hypothèses..... | 27 |
| 7.2.1 Objectif spécifique..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 7.2.2 Hypothèses | 27 |
| Chapitre 8. Interrelation entre le métabolisme <i>In vivo</i> de l'apolipoprotéine B-100, la taille et le nombre des particules LDL | 28 |
| Résumé | 29 |
| Abstract | 30 |
| Introduction..... | 31 |
| Methods..... | 32 |
| Results | 34 |
| Discussion | 35 |
| Conclusion..... | 38 |
| List of abbreviations..... | 39 |
| Acknowledgements | 39 |
| References | 40 |
| Tables and figures | 43 |
| Discussion générale et conclusion..... | 49 |
| Bibliographie | 52 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 Composition en macronutriments des galettes de cinétiques fournies dans les conditions «faible en gras» et «riche en gras» | 24 |
| Tableau 2 Description des études incluses dans l'étude selon les différents protocoles de cinétique | 26 |

Liste des figures et illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 Répartition de la mortalité par maladies non transmissibles (%) | 1 |
| Figure 2 Structure générale d'une lipoprotéine. | 9 |
| Figure 3 Diagramme des voies métaboliques des lipoprotéines d'origine endogène et exogène. | 11 |
| Figure 4 Modèle pluricompartimental simplifié de l'apo-B100 | 17 |
| Figure 5 Représentation graphique des différentes sous-classes de lipoprotéines | 18 |
| Figure 6 Détermination de la taille des particules LDL..... | 19 |
| Figure 7 Représentation schématique d'un protocole de cinétique..... | 25 |

Liste des abréviations et sigles

apo : apolipoprotéine

CM : chylomicrons

HDL : lipoprotéines de haute densité

HMG-CoA : hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A

IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire

LDL : lipoprotéines de faible densité

LDL-apoB : nombre de particules LDL

LDL-C : cholestérol contenu dans les lipoprotéines de faible densité

Lp(a) : lipoprotéine (a)

LPL : lipoprotéine lipase

MCV : maladies cardiovasculaires

rLDL : récepteur des LDL

sdLDL : lipoprotéines de faible densité petites et denses

TG : triglycérides

VLDL : lipoprotéines de très faible densité

Avant-propos

Ce mémoire marque la fin de mon parcours scientifique et est le résultat de deux années de maîtrise en nutrition effectuée à l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels à l'Université Laval. J'ai eu la chance, à travers mes travaux de maîtrise, de toucher à deux projets d'envergure. J'ai pu premièrement participer au volet clinique d'une étude portant sur les oméga-3 et l'inflammation. De manière concomitante, j'ai pu effectuer des analyses de laboratoire et rédiger un article, en tant qu'auteure principale, portant sur une compilation d'études de cinétiques antérieures ayant été réalisées ici, à l'INAF. Cette étude vise une meilleure compréhension des voies métaboliques qui mènent à une augmentation du nombre et une diminution de la taille des particules LDL. C'est sur cette dernière étude que porte ce mémoire.

L'article en question a été soumis aux co-auteurs (Esther M Ooi, Janie Allaire, Jean-Philippe Drouin-Chartier, Caroline Richard, Marie-Eve Labonté, Sophie Desroches, Johanne Marin, André J Tremblay, Patrick Couture et Benoît Lamarche) afin d'obtenir leurs commentaires et suggestions. La collaboration de chacun des auteurs est la suivante : BL et PC ont obtenu le financement et défini le devis de l'étude en question; EMO a effectué la modélisation des données; JPDC, CR, MEL, SD, AJT ont participé à la réalisation des études compilées dans l'article; JA effectuera un suivi du dossier lors de la soumission de l'article; ML et BL ont écrit le manuscrit et ont réalisé les analyses statistiques.

Cette expérience enrichissante, tant sur le plan académique que personnel, n'aurait pas été la même sans l'encadrement et le soutien de nombreuses personnes. Évidemment, la première personne que je tiens à remercier est celle qui m'a permis de vivre cette merveilleuse expérience, mon directeur de maîtrise, Dr Benoît Lamarche. En plus de me faire confiance et de me donner la chance de participer aux volets en clinique et en laboratoire, il a été un mentor hors pair. Il a su me donner des défis intellectuels (et des défis contre la montre!) qui m'ont permis de développer de meilleures méthodes de travail. En plus de ces qualités recherchées pour un mentor, il est doté d'un côté humain exceptionnel. Il a su s'adapter et me conseiller à travers les défis que je lui imposais à mon tour par mon désir d'enseigner et ma grossesse en fin de maîtrise, lesquels lui étaient annoncés selon des délais représentatifs d'un membre de l'équipe Lamarche!

Un énorme merci aussi à Amélie Charest qui a coordonné le projet qui devait être au départ le sujet de ma maîtrise. Amélie est toujours disponible pour écouter et pour aider, c'est une personne exceptionnelle. Son support et ses conseils judicieux m'ont été indispensables, alors que son dynamisme et sa joie de vivre ont fait de mon passage un moment mémorable. Merci énormément à Johanne Marin, ma «coach» de laboratoire! Je ne sais pas comment il aurait été possible de gérer toutes ces données provenant de vieux projets sans son aide précieuse. Sa présence lors des analyses était toujours rassurante et ses conseils utiles. Elle a su me donner confiance et me permettre de vivre deux années tellement enrichissantes.

Un gros merci à toute l'équipe Lamarche, particulièrement aux autres professionnels de recherche, Iris, Valérie et Julie, qui donnent toujours du temps et aident sans compter, et ce, même si elles n'encadraient pas directement mon projet de recherche. Merci aussi à Georges pour son dévouement inspirant, à André pour sa bonne humeur quotidienne et son aide judicieuse lors de mon immersion dans le monde de la cinétique. Finalement, merci à tous les étudiants, autres professionnels et infirmiers de leur aide, d'avoir été présents et d'avoir rendu si agréable la vie à l'INAF.

Bonne lecture!

Chapitre 1. Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent l'ensemble des affections se rapportant au cœur ou aux vaisseaux sanguins. Elles font partie d'un ensemble de maladies appelées maladies non transmissibles, qui causent en totalité plus de 36 millions de décès annuellement, dont près de la moitié sont attribuables aux MCV (1). La **Figure 1** représente le poids relatif de la majorité des maladies non transmissibles en matière de mortalité mondiale, démontrant bien le fardeau causé par les MCV. Malgré l'augmentation des connaissances sur le développement de ces maladies, l'impact social et économique des MCV est toujours grandissant. Malheureusement, la majorité de ces cas pourraient être évités par une amélioration des habitudes de vie des individus et un meilleur dépistage en clinique (1).

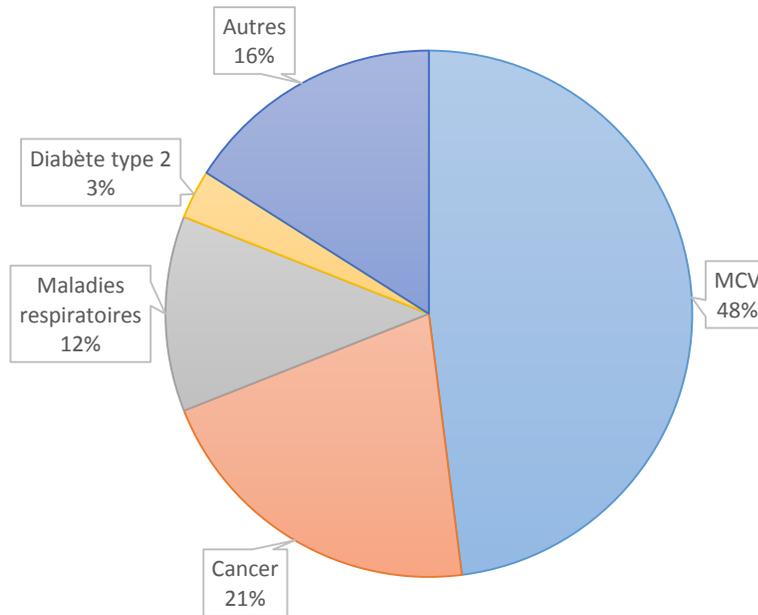


Figure 1 Répartition de la mortalité par maladies non transmissibles (%)
Tirée et adaptée du Journal Africain du Cancer (1)

En vue de diminuer le risque de développer une MCV, l'abaissement des niveaux de cholestérol contenu dans les lipoprotéines de faible densité (LDL-C) est, actuellement, la cible principale de traitement. Ce marqueur est, depuis longtemps, associé à l'apparition de ces maladies. Toutefois, malgré les efforts mis en place, de nombreux cas de MCV surviennent, et ce, malgré des niveaux de LDL-C souvent considérés comme adéquats. Ainsi, depuis plusieurs années, les connaissances sur les facteurs augmentant le risque cardiovasculaire

évoluent sans cesse afin de mieux expliquer cette problématique. En plus des facteurs de risques traditionnels comme le LDL-C, plusieurs autres marqueurs émergents sont maintenant identifiés comme étant reliés au développement des MCV. Ces marqueurs seront vus en détails à la **section 2.1.3**.

D'ailleurs, il est de plus en plus accepté que les individus présentant une prédominance de lipoprotéines de faible densité (LDL) petites et denses (sdLDL) seraient plus à risque de développer une MCV que les individus ayant des particules LDL de plus grosse taille. De plus, l'évaluation du nombre de particules athérogènes en circulation, par la mesure de la concentration d'apolipoprotéine (apo) B100, pourrait être un meilleur marqueur que le LDL-C.

L'élaboration d'une stratégie thérapeutique préventive efficace nécessite une connaissance des origines métaboliques sous-jacentes aux dérèglements lipidiques observables lors de prélèvements de routine. Il importe donc de mieux comprendre les voies métaboliques menant à l'apparition de sdLDL et d'un nombre élevé de particules LDL (LDL-apoB).

Dans ce but, les études de cinétique comportent un avantage majeur comparativement aux analyses de routine habituelles. Effectivement, de par leur protocole, les études de cinétique permettent d'étudier de façon dynamique les processus métaboliques de synthèse et d'élimination qui mènent à l'apparition des phénotypes étudiés.

Ce mémoire a comme but de mieux décrire les modifications métaboliques associées au développement de phénotypes de particules LDL qui augmentent le risque d'athérosclérose. Plus précisément, l'objectif de ce projet de recherche consistait en l'évaluation et la comparaison des voies métaboliques responsables de l'apparition de sdLDL et d'une concentration élevée de LDL-apoB et de LDL-C. Cette comparaison permettait de mettre en exergue les différences entre les déterminants métaboliques de marqueurs moins conventionnels comme la présence de sdLDL et un nombre de particules élevé avec le LDL-C, un marqueur traditionnel des MCV. Dans cette optique, l'incorporation de données provenant d'un regroupement d'études de cinétique était donc appropriée et essentielle.

En premier lieu, ce mémoire présente l'importance de l'impact des MCV dans notre société. S'ensuit la description des mécanismes et facteurs de risques sous-jacents à l'apparition de ces MCV. Puis, est présentée une description des théories et des considérations pratiques des études de cinétiques, suivi d'un article scientifique décrivant une étude de type transversale ayant pour objectif de comparer l'origine métabolique de concentrations élevées de sdLDL, de LDL-apoB et de LDL-C. Finalement, une discussion à propos des données et des résultats obtenus à la suite de cette étude, ainsi qu'une conclusion complètent ce mémoire.

Chapitre 2. Problématique

Le fardeau des MCV a pris une importance considérable dans nos sociétés et alors que d'énormes progrès ont été réalisés quant aux traitements pharmacologiques et médicaux, les taux de morbidité et de mortalité encore causés par ces maladies nous amènent à nous questionner sur les stratégies actuelles de prévention de ces maladies (1). En effet, en dépit des efforts considérables posés dans la prévention des MCV, celles-ci demeurent encore en tête des causes de mortalité au Québec et dans de nombreux pays industrialisés (2). Considérant le caractère asymptomatique du développement de la plupart des conditions cardiovasculaires, il est d'autant plus difficile de traiter la problématique des MCV. D'ailleurs, jusqu'à la moitié des cas de mortalité causés par des événements coronariens ne sont pas précédés d'un diagnostic d'athérosclérose ou de symptômes cardiaques, limitant ainsi la thérapie (3). Il est maintenant bien accepté que l'athérosclérose est la cause physiologique de la majorité des cas de MCV. Toutefois, le développement de celle-ci est le résultat d'un grand nombre de facteurs, modifiables et non-modifiables, compliquant encore une fois le développement de stratégies de prévention efficaces.

À cet égard, de nombreux obstacles se présentent malheureusement dans l'amélioration des traitements préventifs possibles à appliquer en clinique. Les coûts associés à un diagnostic incluant l'évaluation d'un plus grand nombre de facteurs de risque, et ce, non seulement chez la population à risque, représentent une limite importante à la prévention et au traitement de l'athérosclérose et des MCV. De plus, malgré l'importance de la recherche au cours des dernières années, les évidences scientifiques justifiant l'inclusion de certains facteurs de risque émergents dans les recommandations des organismes de santé sont encore parfois insuffisantes.

Il devient donc nécessaire d'évaluer les origines métaboliques de certains de ces facteurs de risque, dits émergents, afin de mieux comprendre ces maladies. Effectivement, une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'apparition de l'athérosclérose permettra éventuellement de mieux cibler les facteurs à évaluer en clinique, d'établir des stratégies efficaces de traitement et possiblement de diminuer le nombre de cas de mortalité causés par les MCV.

2.1 Athérosclérose et MCV

2.1.1 Développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est définie comme étant une affection des parois artérielles et est la cause de la majorité des MCV. L'athérosclérose est causée par une combinaison de facteurs mettant en jeu une accumulation, à l'intérieur des parois artérielles, de lipoprotéines riches en cholestérol accompagnée d'une réponse inflammatoire chronique (4). Les lipoprotéines sont des particules ayant une structure complexe formée d'un assemblage soluble de protéines et de lipides qui permettent le transport des lipides et d'autres nutriments insolubles dans la circulation sanguine (5). On distingue cinq classes majeures de lipoprotéines qui sont définies selon leur taille et leur densité, chacune ayant un rôle et des effets spécifiques sur la santé d'un individu. Une attention particulière sera portée au métabolisme des lipoprotéines au **Chapitre 3**.

Le développement de l'athérosclérose est un processus continu et complexe qui s'étend sur de nombreuses années. D'ailleurs, le mécanisme complet de l'évolution de cette pathologie n'est pas encore compris en totalité, particulièrement aux étapes précoces asymptomatiques. Toutefois, il est maintenant accepté qu'un dérèglement de l'endothélium, tissu tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins, permette l'initiation du processus athérosclérotique (6). En conditions physiologiques normales, l'endothélium régule, entre autres, le tonus vasomoteur et la perméabilité des parois vasculaires, en plus de moduler certaines réponses inflammatoires (7). Ces fonctions de l'endothélium ont des effets anti-thrombotiques et permettent une adaptation physiologique en réponse à des perturbations. Lors de stimulations prolongées, l'endothélium peut subir un dérèglement et perdre ce potentiel adaptatif. Cette dysfonction implique, entre autres, un abaissement de la capacité du tissu endothélial à la vasodilatation en réponse à des stimuli (8).

Dans le développement de l'athérosclérose, le dérèglement endothélial favorise la formation de la strie lipidique, première lésion observable du processus qui exacerbe, à son tour, la dysfonction de l'endothélium vasculaire. La strie lipidique se caractérise par une accumulation de lipoprotéines enrichies en cholestérol, principalement des LDL, et par un épaississement de l'intima (6). À cette étape, une régression de la lésion athérosclérotique peut être encore possible si des mesures de préventions adéquates sont appliquées (6). Toutefois, si aucun traitement n'est envisagé, la progression de l'athérosclérose sera continue et possiblement irréversible. L'accumulation de lipides à l'intérieur des parois vasculaires favorise le recrutement et l'infiltration des monocytes qui se transformeront en macrophages, puis en cellules spumeuses. Cet amas de lipides et de molécules inflammatoires dans l'intima forme la plaque fibreuse. Par la sécrétion de cytokines inflammatoires, les macrophages intensifieront le processus athéromateux en augmentant le recrutement des monocytes et en induisant une inflammation chronique, ce qui causera éventuellement une fragilisation de la plaque (6, 9). Cette plaque pourra alors se rompre et causer diverses complications, telles que l'infarctus du myocarde ou l'accident

vasculaire cérébral. Par contre, malgré le mécanisme proposé, le développement de l'athérosclérose varie d'un individu à l'autre et peut être intensifié par divers facteurs de risque qui ont un effet sur l'inflammation et les particules LDL.

2.1.2 Facteurs de risque conventionnels des MCV

Les MCV sont multifactorielles et l'exposition à différents facteurs a été identifiée comme augmentant le risque d'athérosclérose et éventuellement, de souffrir d'une MCV. Ces facteurs de risque peuvent être séparés en deux catégories : les facteurs de risque modifiables et ceux non modifiables.

De manière traditionnelle, les facteurs de risque non modifiables sont l'âge, le sexe et les prédispositions génétiques (10). Bien que l'impact de ces facteurs soit reconnu, l'individu n'a aucun pouvoir sur ceux-ci. À l'inverse, les facteurs de risque modifiables sont des éléments qui augmentent le risque de souffrir d'une MCV, mais sur lesquels l'individu peut exercer une influence. Ces facteurs comptent le tabagisme, la diète, l'obésité et le sédentarisme (10). Tous ces facteurs ont évidemment une influence physiologique et, cliniquement, divers biomarqueurs sont maintenant grandement utilisés lors de l'évaluation du niveau de risque. Ainsi, les altérations de la pression artérielle, du métabolisme du glucose et des lipides sanguins, peuvent être diagnostiquées et considérées dans le dépistage (10).

Évidemment, toutes ces affections présentes de manière individuelle augmentent le risque de MCV, mais il semblerait y avoir, en plus, une interaction métabolique complexe entre celles-ci (11). Par exemple, la présence d'hypertension semble favoriser l'infiltration des particules LDL dans les parois artérielles, processus qui a tendance à s'aggraver en présence d'une grande concentration de ces particules en circulation (11).

Des données provenant d'études prospectives de grande envergure, soient la *Framingham Heart Study* et la *Seven Country Study*, ont permis initialement d'identifier quatre facteurs de risque majeurs parmi ceux mentionnés. Depuis, de nombreuses études ont confirmé l'importance de traiter ces facteurs de risque de manière prioritaire (12-15). Ainsi, du côté clinique, le traitement et le dépistage de dyslipidémies, d'une pression artérielle élevée et du diabète sont prioritaires dans la plupart des recommandations, au même titre que la prévention du tabagisme (16, 17).

Les particules LDL sont au centre du développement des complications vasculaires et, donc, elles sont fortement associées au développement de l'athérosclérose et de ses complications. Cela explique bien pourquoi, à ce jour, le traitement des dyslipidémies est la cible principale de toutes les recommandations nationales et internationales (18). D'ailleurs, au Canada, les lignes directrices visent particulièrement l'abaissement des niveaux de LDL-C (19-22).

2.1.3 Facteurs de risque non conventionnels des MCV

Étant donné l'ampleur du fardeau représenté par les MCV dans nos sociétés, de plus en plus d'efforts ont été fournis afin d'identifier de nouveaux facteurs de risque pouvant mener à de meilleures stratégies de prévention. Ainsi, de nombreux facteurs de risque émergents ont pu être identifiés et corrélés à un risque cardiovasculaire plus élevé, mais seuls quelques-uns d'entre eux seront abordés dans le cadre de ce travail.

Parmi ces facteurs de risque non conventionnels, nous comptons des niveaux élevés de lipoprotéine (a) (Lp(a)), une inflammation chronique, une prépondérance de sdLDL et une concentration élevée d'apo-B100 (23). Dans le cadre de ce travail, seuls ces quatre derniers facteurs de risque émergents seront abordés, bien que la littérature permette actuellement d'en identifier de nombreux autres qui sont associés au développement des MCV. Tout comme les facteurs traditionnels, la présence concomitante de plusieurs de ces prédispositions peut augmenter, de manière importante, le risque de MCV.

La Lp(a) pourrait être définie comme étant une particule LDL à laquelle une apo-(a) est liée de manière covalente. La présence de cette apo-(a) en surface de la lipoprotéine lui confère des propriétés thrombotiques (24). De plus, les concentrations de Lp(a) sont peu affectées par les hypolipémiants couramment utilisés dans le cadre de dyslipidémie (24). Toutefois, le rôle métabolique complet de la Lp(a) serait toutefois encore mal compris. Il a été suggéré que celle-ci pourrait augmenter la perméabilité des cellules endothéliales, l'expression des molécules d'adhésion vasculaire et la chimiotaxie des monocytes, ce qui facilite l'infiltration des LDL à l'intérieur des parois artérielles (25).

L'importance de l'inflammation au sein du développement de l'athérosclérose est maintenant bien acceptée. L'inflammation de la lésion athérosclérotique peut mener à un état inflammatoire chronique et accentuer le développement de la strie lipidique, et ce, jusqu'à la rupture de la plaque (26). Plusieurs protéines et cytokines peuvent être utilisées en laboratoire pour détecter cet état inflammatoire chronique, mais la protéine C-réactive est, à ce jour, le meilleur biomarqueur en termes d'utilité au diagnostic et celui le plus couramment utilisé (27, 28). Cette protéine joue un rôle principal dans la réponse immunitaire innée et est synthétisée lors de la phase aigüe de la réponse inflammatoire (28).

Une prépondérance de petites particules à travers la classe des LDL est aussi reconnue comme étant un facteur de risque indépendant des MCV. En effet, les particules LDL présentant un diamètre inférieur à 255 Å, par rapport à des LDL de plus grande taille s'infiltrent et s'accumulent de façon plus importante dans les parois artérielles (29). Puisque ce facteur de risque constitue un thème majeur dans ce mémoire, les mécanismes susceptibles d'expliquer la contribution des sdLDL dans le développement de l'athérosclérose seront détaillés au **Chapitre 5**.

Finalement, la présence de fortes concentrations d'apo-B100 est aussi associée à un risque élevé de MCV. De nombreuses études démontrent des évidences qui suggèrent d'utiliser préférentiellement cette valeur d'apo-B100 dans l'évaluation du risque cardiovasculaire, plutôt que la valeur de LDL-C (30-33). Considérant l'importance de ce facteur de risque en lien avec le sujet principal de ce mémoire, les mécanismes par lesquels la concentration en apo-B100 influence le risque cardiovasculaire feront l'objet du **Chapitre 6**.

2.1.4 Méthode actuelle d'évaluation du risque

De nombreuses études supportent chacun de ces facteurs de risque, mais seuls quelques-uns sont considérés en clinique. D'ailleurs, l'hypercholestérolémie, définie comme un niveau élevé de LDL-C, constitue, à ce jour, l'une des premières cibles de traitement suggérée par les directives des différents organismes de santé (34). Le LDL-C correspond à un estimé de la masse de cholestérol contenue dans la fraction LDL, calculé dans la plupart des laboratoires à partir de l'équation de Friedewald (35). Cette équation permet d'approximer, de manière acceptable, les niveaux de cholestérol contenu dans la fraction LDL à l'aide de la concentration de cholestérol total duquel est soustrait le HDL-C et de la concentration des triglycérides (TG) en mmol/L divisée par 2,2 (36). À titre préventif, l'utilisation de statines dans le but d'atteindre des niveaux de LDL-C considérés acceptables est maintenant grandement répandue et reconnue comme efficace (37). Toutefois, malgré l'application de ce traitement, de nombreux cas de MCV surviennent en dépit de niveaux de LDL-C considérés comme optimaux et dans ces cas-ci, les MCV seraient plutôt causées par d'autres altérations du profil lipidique (38-40).

D'ailleurs, l'utilisation du LDL-C comme biomarqueur principal d'un dérèglement du métabolisme des lipides et de lésions athérosclérotiques probables suggère que le cholestérol contenu dans les lipoprotéines serait un facteur plus athérogène que la lipoprotéine elle-même. À l'inverse, de nombreuses études démontrent que d'autres phénotypes associés aux particules LDL sont aussi corrélés à un risque cardiovasculaire élevé. Entre autres, une prédominance de sdLDL à travers le profil lipidique et une concentration élevée d'apo-B100 sont deux facteurs reconnus pour avoir une influence considérable sur le niveau de risque (10, 40-42). Considérant les évidences de plus en plus nombreuses sur le sujet, il semble primordial de mieux définir les dérèglements métaboliques pouvant causer ces différents phénotypes athérogènes.

Chapitre 3. Les lipoprotéines

3.1 Le métabolisme des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules permettant le transport, à travers le système sanguin, de lipides et d'autres molécules liposolubles. Tel que mentionné précédemment, elles jouent un rôle de premier plan dans le développement proposé de l'athérosclérose. La prochaine section a pour but de mieux définir le rôle, la structure et le métabolisme de chacune des classes de ces particules.

3.1.1 Les différentes lipoprotéines

Les lipoprotéines sont catégorisées en cinq classes majeures selon leur densité et leur taille respectives. Chaque classe de lipoprotéine possède des caractéristiques particulières en lien avec leur rôle à travers le métabolisme lipidique.

3.1.1.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons (CM) sont les lipoprotéines synthétisées dans l'intestin lors de l'absorption des graisses pendant la digestion. Ces lipoprotéines sont responsables du transport des lipides d'origine alimentaire de l'intestin vers les tissus (43). La taille des particules de CM varie entre 100 et 250 nm et étant majoritairement constituées de lipides à plus de 99%, ce sont les lipoprotéines possédant la plus faible densité (44).

3.1.1.2 Les lipoprotéines de très faible densité

Les lipoprotéines de très faible densité ou «*very low density lipoproteins*» (VLDL) sont synthétisées par le foie et permettent la circulation du cholestérol d'origine endogène vers les tissus. Bien qu'elles contiennent une plus grande proportion de protéines que les CM, les VLDL contiennent un niveau élevé de lipides, soit entre 90% et 93% de leur composition totale (43). Ces particules ont un diamètre variant entre 30 et 110 nm (44).

3.1.1.3 Les lipoprotéines de densité intermédiaire

Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) sont le résultat de l'hydrolyse des VLDL et sont les précurseurs des LDL. Étant rapidement métabolisées, elles n'apparaissent que brièvement dans la circulation sanguine. Les particules IDL peuvent avoir une taille variant entre 25 et 35 nm (45).

3.1.1.4 Les lipoprotéines de faible densité

Les LDL sont aussi plus communément connues sous le terme «mauvais cholestérol». En effet, puisque ces lipoprotéines sont chargées d'acheminer le cholestérol vers les tissus, leur augmentation dans la circulation sanguine est associée à de nombreuses complications métaboliques. D'ailleurs, leur rôle dans le développement de l'athérosclérose est bien reconnu. La densité et le diamètre des LDL varient respectivement entre 1,006 et 1,0063 et entre 18 et 25 nm (5, 45)

3.1.1.5 Les lipoprotéines de haute densité

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) diffèrent des autres types de lipoprotéines du point de vue de leur fonction et de leur origine. En effet, les HDL sont responsables du transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire qu'elles permettent d'acheminer les résidus lipidiques non-utilisés par les tissus périphériques vers le foie où ils seront utilisés ou éliminés. La taille des HDL peut varier entre 7,6 à 10,6 nm (5) et elles peuvent contenir approximativement 50% de protéines (46). L'apo-AI est l'apo principale des HDL et elle peut être présente en plus d'une copie par particule. Elle représente à elle seule environ 70% de la masse protéique des HDL (47).

3.1.2 Structure des lipoprotéines

La structure générale des lipoprotéines est la même pour chacune des classes, comme illustré à la **Figure 2**. Les particules sont constituées d'une enveloppe sphérique formée de lipides amphipathiques et de protéines, les apo, à l'intérieur desquelles se retrouve un mélange de lipides hydrophobes, principalement des TG, et du cholestérol sous forme estérifiée (5, 45).

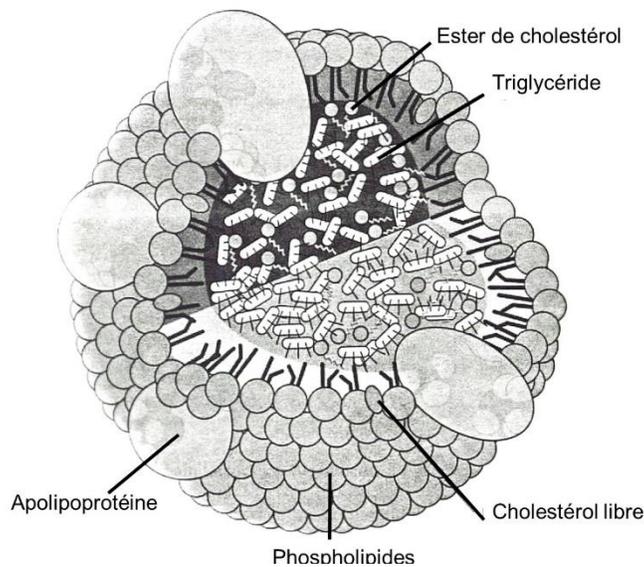


Figure 2 Structure générale d'une lipoprotéine.

Figure adaptée de *Lipoproteins and Cardiovascular Diseases* (48)

Même si l'organisation générale structurelle des différentes lipoprotéines est semblable, les apo retrouvées à la surface de chacune des particules sont, en partie, spécifiques au type de lipoprotéine. Ces apo structurelles peuvent être distinguées selon deux catégories : fixes et solubles. D'une part, ces dernières peuvent être interchangeables et échangées entre les différentes lipoprotéines. D'autre part, les apo fixes sont liées, lors de la synthèse, à une lipoprotéine particulière et le resteront pendant les différentes modifications métaboliques de la particule, jusqu'à ce que cette dernière soit éliminée de la circulation sanguine à l'aide de récepteurs spécifiques

(49). Ces apo se retrouvent en une seule copie à l'extérieur de la lipoprotéine et permettent, entre autres, d'identifier et de déterminer la fonction de celle-ci. Ainsi, l'apo-B48 se retrouve uniquement au niveau des CM et l'apo-B100 est l'apo principale des lipoprotéines permettant le transport des lipides d'origine endogène (VLDL, IDL et LDL) (45).

3.1.3 Métabolisme des lipoprotéines : un survol

Le métabolisme des lipoprotéines peut être caractérisé selon l'origine des lipides à métaboliser, soit exogène ou endogène. Un schéma résumé du métabolisme des lipides d'origine endogène et exogène est présenté à la **Figure 3**. En période postprandiale, les gras alimentaires, principalement des TG et des phospholipides, sont absorbés par les cellules intestinales, à l'aide entre autres des sels biliaires sécrétés par le foie. Ils sont ensuite redistribués dans la circulation sanguine où ils pourront être métabolisés, utilisés ou emmagasinés. Ce transport des lipides d'origine exogène, de l'intestin vers les tissus, est possible grâce aux CM. La synthèse de ces lipoprotéines s'effectue principalement au niveau des entérocytes (43).

À l'inverse, le transport des lipides d'origine endogène du foie vers les tissus est assuré par les VLDL, synthétisées *de novo* par les cellules hépatiques. La synthèse endogène de cholestérol est d'ailleurs la principale source de cholestérol de l'organisme. Les VLDL nouvellement synthétisées possèdent à leur surface une seule copie de l'apo-B100 et un nombre variable d'apo-CI, d'apo-CII, d'apo-CIII et d'apo-E.

La cascade hydrolytique des particules VLDL permet de générer les IDL, qui, à leur tour, seront hydrolysées pour former les LDL (50). La sécrétion des VLDL par le foie peut être modifiée selon le statut lipidique et les besoins d'un individu, par une variation du nombre de particules sécrétées ou par une altération de la taille de ces particules. L'activité de lipoprotéine lipase (LPL), enzyme qui hydrolyse les TG contenus dans les VLDL et les CM, est modulée par le ratio entre l'apo-CII et l'apo-CIII (51). Plus précisément, l'apo-CIII interfère avec l'activation de la LPL par l'apo-CII (52). Donc, une augmentation de la proportion d'apo-CIII en comparaison celle d'apo-CII, à la surface des VLDL diminuera l'efficacité avec laquelle ces lipoprotéines seront hydrolysées.

Les lipoprotéines générées sous l'effet de la LPL, les IDL, seront retournées au foie pour leur élimination de la circulation sanguine ou hydrolysées de nouveau. Les IDL verront leurs TG se faire hydrolyser grâce à la lipase hépatique ou, à plus faible proportion, à la lipase endothéliale. Les résidus de l'hydrolyse des IDL sont des LDL, des lipoprotéines avec un haut contenu en cholestérol estérifié.

Les particules LDL circulantes sont finalement reconnues par le récepteur des LDL (rLDL) qui lie et permet l'internalisation des lipoprotéines plasmatiques présentant l'apo-B100 ou l'apo-E à leur surface (53, 54). Le rLDL fait partie d'une famille de récepteurs appelée les récepteurs LDL. Cette famille de récepteur permet de réguler de manière importante le métabolisme des lipides et comprend l'ensemble des récepteurs suivants : le rLDL, le

VLDLr, l'apoER2, le LDLr-related protein (53). Toutefois, seul le rLDL sera discuté dans le cadre de la présente thèse. Ainsi, vu son affinité avec les apo-B100 et apo-E, le rLDL reconnaît les particules LDL, mais n'est pas spécifique à celles-ci, il peut aussi internaliser les IDL, les VLDL et les résidus de CM. Ce récepteur se retrouve en plus ou moins grand nombre à la surface des cellules des tissus périphériques ou du foie, selon les besoins en lipides de ceux-ci (55). Le rLDL joue donc un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol et de l'élimination des LDL de la circulation sanguine. Puisque les LDL présentent, à leur surface, une seule copie de l'apo-B100 et un nombre variable d'apo-E, une augmentation du nombre de cette dernière aura pour effet d'augmenter l'affinité de la lipoprotéine avec le rLDL (56). Toutefois, la présence de l'apo-CIII inhiberait la liaison du récepteur avec l'apo-E ou l'apo-B100 (56, 57).

Les particules LDL circulantes peuvent donc se retrouver en circulation plus ou moins longtemps selon leur affinité avec leur récepteur spécifique. Elles peuvent aussi subir des hydrolyses supplémentaires avant leur internalisation, ces hydrolyses pouvant causer des variations au niveau de la taille et de la densité des particules LDL circulantes.

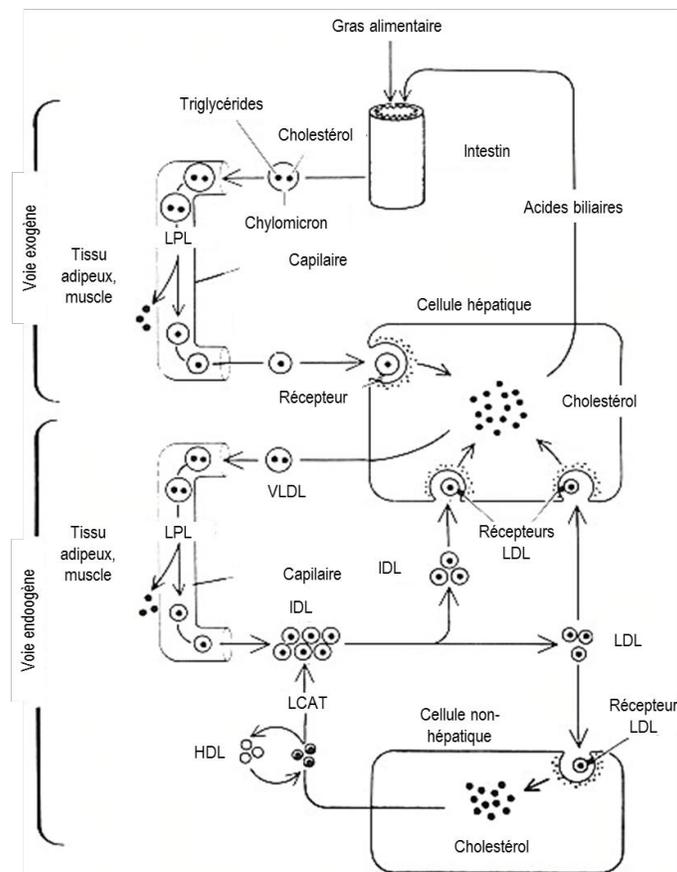


Figure 3 Diagramme des voies métaboliques des lipoprotéines d'origine endogène et exogène.

Figure adaptée de *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition (58)

Finalement, les HDL, qui constituent la dernière classe de lipoprotéines, sont responsables du transport inverse du cholestérol et, donc, de sa disparition de la circulation sanguine. Plusieurs études populationnelles ont démontré une association inverse entre la prévalence de MCV et les niveaux de HDL-C, suggérant une action cardioprotectrice des particules HDL (59, 60). L'origine des HDL matures est dérivée des HDL discoïdales sécrétées par le foie et de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG, contenant principalement l'apo-E (61). Ces particules discoïdales sont initialement appauvries en cholestérol. Les particules HDL contiennent aussi un nombre variable d'apo-AI, synthétisée au niveau des cellules intestinales et hépatiques (61). La forme immature des HDL peut ensuite s'enrichir en molécules de cholestérol et de TG en les captant des tissus périphériques et autres lipoprotéines circulantes afin de former les HDL matures. L'enzyme CETP permet cet échange de cholestérol et de TG entre les lipoprotéines d'origine endogène et les HDL (62). Les HDL matures seront finalement éliminées de la circulation sanguine, par le foie principalement, mais aussi par les autres tissus périphériques (61).

3.1.4 Déterminants des niveaux de LDL-cholestérol

En situation normale, la régulation du métabolisme lipidique et des concentrations des différentes lipoprotéines s'effectue selon un contrôle rigoureux. Toutefois, tel que mentionné précédemment, des concentrations élevées de LDL-C sont observés lors de dérèglements menant au développement de l'athérosclérose. De nombreuses études se sont donc penchées sur les déterminants métaboliques causant cette augmentation de LDL-C. Les facteurs influençant ces derniers peuvent être de différentes sources. Ainsi, afin d'atteindre les cibles lipidiques recommandées, diverses stratégies sont maintenant couramment utilisées. Les directives proposées incluent la modification de certaines habitudes de vie. L'utilisation d'agents thérapeutiques dans un cadre de prévention chez les individus plus à risque est aussi suggérée et grandement répandue.

Une saine alimentation et une augmentation du niveau d'activité physique peuvent aussi jouer un rôle majeur dans le traitement des dyslipidémies. De plus, ces modifications d'habitudes de vie viendront possiblement moduler certains autres facteurs de risque de MCV, tels que l'obésité, l'hypertension et le diabète de type 2. Les recommandations américaines actuelles, définies par la *American Heart Association*, suggèrent d'inclure 40 minutes d'activité physique 3 à 4 fois par semaine afin de diminuer la pression sanguine et les niveaux de LDL-C (20). Toutefois, bien que l'activité physique soit bénéfique en général sur la santé cardiovasculaire, les effets directs de l'exercice physique sur les niveaux de LDL-C restent mineurs (63). Il est aussi suggéré d'augmenter les apports en fruits, légumes et grains entiers, d'inclure des produits laitiers et des viandes faibles en gras et de limiter les apports en sucreries, boissons sucrées et viandes rouges (20). D'ailleurs, il est de plus en plus reconnu qu'une diète de type méditerranéenne aurait aussi un impact bénéfique sur les niveaux de LDL-C, et ce, en plus de diminuer le risque cardiovasculaire global (64).

D'un point de vue thérapeutique, les statines, agents hypocholestérolémiants les plus utilisés, inhibent la hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, une enzyme clé régulant le métabolisme du cholestérol. L'inhibition de cette enzyme par les statines induit une diminution de la production de cholestérol endogène, causant une diminution de la concentration de cholestérol à l'intérieur des cellules. Cette diminution a pour effet d'augmenter le nombre de récepteurs cellulaires responsables de la captation des LDL plasmatiques en circulation (65). Il est à noter que d'autres agents hypocholestérolémiants sont aussi disponibles et de plus en plus utilisés en clinique. Ainsi, les inhibiteurs de l'absorption du cholestérol peuvent aussi être considérés dans l'élaboration d'un plan de traitement lors d'hypercholestérolémie (65). Toutefois, tous ces traitements thérapeutiques, bien qu'efficaces pour diminuer les niveaux de LDL-C, ne moduleront le risque cardiovasculaire que par leur effet sur les lipides sanguins. Il est donc suggéré de combiner tout traitement thérapeutique à de bonnes habitudes alimentaires et à de l'activité physique régulière.

En ce qui concerne le métabolisme, les causes de l'hypercholestérolémie sont controversées. En effet, dans le cadre d'études de cinétique, lesquelles permettent d'examiner le métabolisme de manière dynamique (**Chapitre 4**), une production accrue de particules LDL a été démontrée comme étant la cause principale de concentrations élevées de LDL-C (66, 67). Toutefois, dans le cas d'hypercholestérolémie familiale, les niveaux plasmatiques très élevés de LDL-C sont depuis longtemps reconnus comme étant la conséquence directe de mutations génétiques du rLDL (67, 68). La présence d'une mutation peut influencer l'habileté du récepteur à capter les LDL en circulation, ce qui a pour effet de diminuer considérablement l'élimination de ces particules de la circulation sanguine (67, 68). Il s'avérerait donc que les deux facteurs métaboliques, une production de particules trop élevée et une déficience dans l'élimination de celles-ci, soient en cause dans le développement de l'hypercholestérolémie.

Chapitre 4. Étude du métabolisme lipidique

4.1 Études de cinétique

Bien qu'il soit possible d'obtenir des informations pertinentes sur le statut lipidique d'un individu grâce à des prélèvements sanguins réguliers, ces informations ne renseignent que sur la situation au moment précis du prélèvement. D'aucune manière il n'est possible d'obtenir des renseignements sur la manière dont le métabolisme de l'individu fonctionne, car les valeurs obtenues lors de ce type de prélèvement sont des valeurs statiques, comme une photographie de l'état physiologique à un moment fixe. Afin de faire la démonstration des origines métaboliques des différents phénotypes des particules LDL, soient le nombre, la taille et la quantité de cholestérol transporté par ces particules, il importe de bien comprendre et de caractériser les mécanismes physiologiques complexes régulant la sécrétion et le catabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Les études de cinétique nous permettent actuellement de décrire les processus physiologiques sous-jacents à la synthèse de diverses protéines. D'ailleurs, à l'heure actuelle, cette méthode validée constitue la procédure de référence nous permettant de caractériser l'origine métabolique des dyslipidémies (69). Toutefois, les coûts, le matériel nécessaire et le temps associé à cette méthode limite son application en recherche.

Le principe des études de cinétique repose sur le marquage de la protéine d'intérêt, de manière à suivre les transformations successives que subira celle-ci à travers les cascades métaboliques jusqu'à sa disparition du système. L'isotopomère de D3-leucine est identifiée comme étant le traceur, alors que la leucine native représente le tracé. La cinétique de la protéine d'intérêt choisie peut être mesurée en suivant l'incorporation du traceur dans cette protéine. Dans le cas d'étude du métabolisme des lipoprotéines, le plasma constitue le système étudié, alors que la protéine marquée est l'apo-B100. La méthodologie précise des études de cinétique présentées dans ce travail sera décrite davantage à la **section 4.1.2**. Il est à noter qu'afin d'obtenir des renseignements justes sur les voies métaboliques empruntées par le tracé, le traceur ne doit pas être métabolisé de manière distincte du tracé, ni perturber le système. Toutefois, il doit être possible, pour l'investigateur, de reconnaître et de suivre l'évolution du traceur après son entrée dans les diverses cascades biologiques.

Il est possible d'effectuer un marquage de type exogène, qui consiste à isoler puis à identifier et marquer le tracé de manière *in vitro*, pour ensuite le réinjecter chez le patient. Les traceurs exogènes utilisent habituellement des radio-isotopes, tel que l'iode¹²⁵ (70). Cette méthode est de moins en moins utilisée étant donné le plus grand risque de contamination pour le patient et la métabolisation subséquente du tracé pouvant être différente de la protéine d'origine, mais principalement, étant donné le risque d'exposition radioactive associée à l'utilisation des radio-isotopes(71).

À l'opposé, un marquage de type endogène est effectué par une infusion intraveineuse (constante ou impulsion de type bolus) d'un précurseur métabolique identifiable, alors que l'incorporation de ce dernier est effectuée directement lors de la synthèse de la protéine d'intérêt. Le marquage s'effectue donc, à proprement parler, *in vivo*. Cette méthode de marquage a l'avantage de renseigner à propos de la synthèse de la protéine d'intérêt par l'apparition graduelle de protéines marquées dans le plasma (69). Ce type de marquage peut être effectué à l'aide d'isotopes stables ou de radio-isotopes. Vu leur faible risque pour la santé, les isotopes stables sont de plus en plus utilisés dans les protocoles de cinétique (71). L'utilisation d'un acide aminé préalablement marqué, par exemple la leucine deutérée (D3-leucine), est maintenant fréquente (72, 73).

Tous les protocoles de cinétique présentés dans ce mémoire sont d'ailleurs effectués selon cette méthode de marquage endogène. De plus, puisque seuls les isotopes stables ont été utilisés dans le cadre des présents travaux, seuls ceux-ci seront décrits davantage dans la prochaine section.

4.1.1 Marquage à l'aide d'isotopes stables

Dans le cas d'études de cinétique, l'utilisation de protéines marquées à l'aide d'acides aminés couplés à des isotopes stables est maintenant reconnue (74, 75). Un isotope stable peut être décrit comme étant un isotope non radioactif d'un élément donné (76). L'incorporation d'isotopes stables dans la structure moléculaire d'acides aminés permet de créer des isotopomères qui possèdent une masse distincte du même acide aminé non marqué. Puisque la charge, l'hydrophobicité et la structure tridimensionnelle de la molécule ne sont pas affectées par ce marquage, il est possible de supposer que cela ne modifiera pas la manière dont l'acide aminé d'intérêt et donc, la protéine d'intérêt, sera métabolisé. Toutefois, il est possible de suivre ce traceur et son incorporation dans la protéine d'intérêt étant donné la différence de masse entre les isotopomères. Dans le cadre d'études sur le métabolisme, il importe de choisir comme marqueur une molécule qui ne peut pas être synthétisée par le corps humain, tels que les acides aminés essentiels par exemple. Puisqu'aucun autre apport en cet acide aminé n'est fourni lors de la cinétique, ceci permet d'induire l'utilisation du marqueur uniquement. D'ailleurs, une étude comparant l'utilisation différentielle de leucine, valine et lysine deutérée sur la mesure des paramètres de cinétique de l'apo-B100 et de l'apo-AI a mené à des résultats semblables avec les trois acides aminés différents, lors de cinétiques de type impulsion-infusion constante (77).

4.1.2 Modélisation et application au métabolisme des lipoprotéines

Lors des études de cinétique présentées dans ce mémoire, l'isotopomère utilisé dans le but de marquer l'apo-B100 était la D3-leucine. L'enrichissement des fractions lipoprotéiques en apo-B100 marquée avec la D3-leucine pouvait être suivi grâce à des prélèvements sanguins effectués à des heures fixes. Ensuite, ces données d'enrichissements ont été modélisées afin de décrire, de la manière la plus juste possible, le comportement métabolique de l'apo-B100.

La modélisation des systèmes biologiques complexes sous-jacents au métabolisme des lipoprotéines est effectuée, dans le cadre des présents travaux, à l'aide de modèles pluricompartimentaux. Le principe derrière ce modèle est la description des voies métaboliques à l'aide de compartiments reliés entre eux. Un compartiment est défini par une certaine quantité plasmatique homogène à l'équilibre de la protéine d'intérêt, c'est-à-dire qu'un compartiment contient une quantité stable d'une substance qui ne varie pas avec le temps (76). Cette quantité est aussi appelée «*pool*». Dans le modèle pluricompartimental, les différents compartiments sont reliés par des constantes de transfert qui représentent la quantité de la substance d'intérêt qui est métabolisée vers un autre compartiment ou, encore, catabolisée de manière définitive. Dans le cadre d'études de cinétique, le catabolisme correspond à la disparition de la protéine d'intérêt du système à l'étude, donc ici le plasma. Considérant que la quantité à l'intérieur des compartiments ne varie pas avec le temps, ce modèle suppose que la quantité de matière qui entre et sort de chacun des compartiments se contrebalance (76). Ce type de modélisation semble être la méthode la plus juste et appropriée pour décrire le métabolisme complexe des lipoprotéines (76).

La **Figure 4** représente un modèle simplifié du métabolisme de l'apo-B100 à travers la cascade métabolique des lipoprotéines. C'est-à-dire que cette figure, où chaque compartiment représente un état particulier de l'apo-B100, permet d'illustrer le cheminement de l'apolipoprotéine marquée à partir du moment de sa synthèse jusqu'à sa disparition du système à l'étude. Plus précisément, les compartiments circulaires (1, 3, 4 et 5) représentent l'apo-B100 à travers ses différents états dans la cascade métabolique, selon qu'elle est associée aux VLDL, IDL ou LDL. Plus précisément, le *pool* précurseur de la D3-leucine est représenté par le compartiment 1, alors que l'apo-B100 associée aux fractions VLDL, IDL et LDL est illustrée à l'aide des compartiments 3, 4 et 5 respectivement. Le compartiment de forme rectangulaire représente un délai observé entre le moment de l'infusion et l'apparition de la protéine marquée au sein des VLDL. Il est supposé que le délai serait causé par la synthèse de la protéine.

En concordance avec le modèle, chaque compartiment contient une certaine masse de la protéine d'intérêt, qui ne varie pas avec le temps. Afin d'évaluer cette quantité de matière, les différentes fractions lipoprotéiques sont isolées et séparées à partir des échantillons sanguins, selon un gradient de densité correspondant à la densité de chacune des classes de lipoprotéines. Finalement, le dosage de l'apo-B100 est effectué en laboratoire dans chacune de ces fractions. Les flèches symbolisent les constantes de transfert entre les différents compartiments, soit la quantité d'apo-B100 passant d'un compartiment à un autre, ou d'une fraction lipoprotéique à un autre, par unité de temps.

Donc, le modèle décrit un état dynamique permettant de représenter le taux de production et d'élimination de l'apo-B100 à travers les différentes fractions lipoprotéiques. Les flèches pointant vers l'extérieur d'un compartiment représentent une fraction de l'apo-B100 éliminée et catabolisée de manière définitive de ce

compartiment. L'ensemble des flèches sortant d'un compartiment peut être défini comme le taux catabolique fractionnel (*fractional catabolic rate*, FCR). À l'inverse, les flèches entrant dans un compartiment expriment de manière visuelle le taux de production (*production rate*, PR) de ce compartiment. Ainsi, le FCR et le PR nous donne respectivement la vitesse d'élimination et de synthèse d'un catabolite.

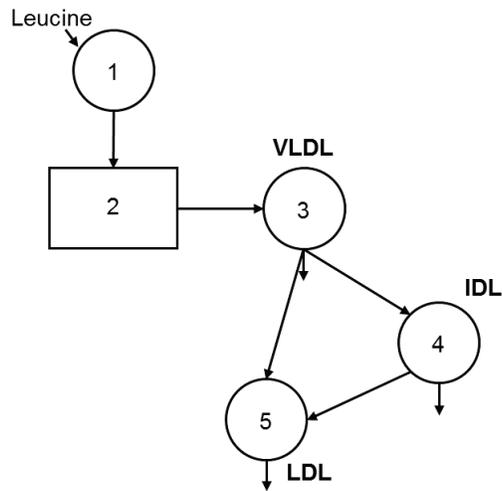


Figure 4 Modèle pluricompartimental simplifié de l'apo-B100

Ce type de modèle peut être créé grâce à des logiciels permettant de générer un système d'équations différentielles sous une forme schématique (telle que présentée à la **Figure 4**), qui décrit les données provenant de l'enrichissement dans le temps de la protéine d'intérêt. Le logiciel SAAM II a été utilisé afin de générer les différents modèles cinétiques dans le présent mémoire (78).

Chapitre 5. Hétérogénéité des particules LDL et MCV

Tel que mentionné précédemment, les différentes lipoprotéines sont catégorisées en cinq classes selon un étendu défini en terme de taille et de densité des particules. Par contre, il existe une certaine variation à l'intérieur de chacune de ces classes. Évidemment, puisque les particules LDL sont les principaux transporteurs de cholestérol dans l'organisme, l'effet d'une variation de taille à l'intérieur de cette classe a été particulièrement étudié. Ainsi, des sous-classes distinctes de LDL ont pu être identifiées et caractérisées, toujours selon leur taille et leur densité (79). Le **Figure 5** représente graphiquement cette variabilité pour chacune des classes de lipoprotéines. On distingue trois sous-classes majeures de particules LDL : les sdLDL ayant un diamètre inférieur à 255 Å, les grosses particules LDL avec un diamètre supérieur à 260 Å et les particules de tailles intermédiaires ayant un diamètre entre 255 Å et 260 Å (79).

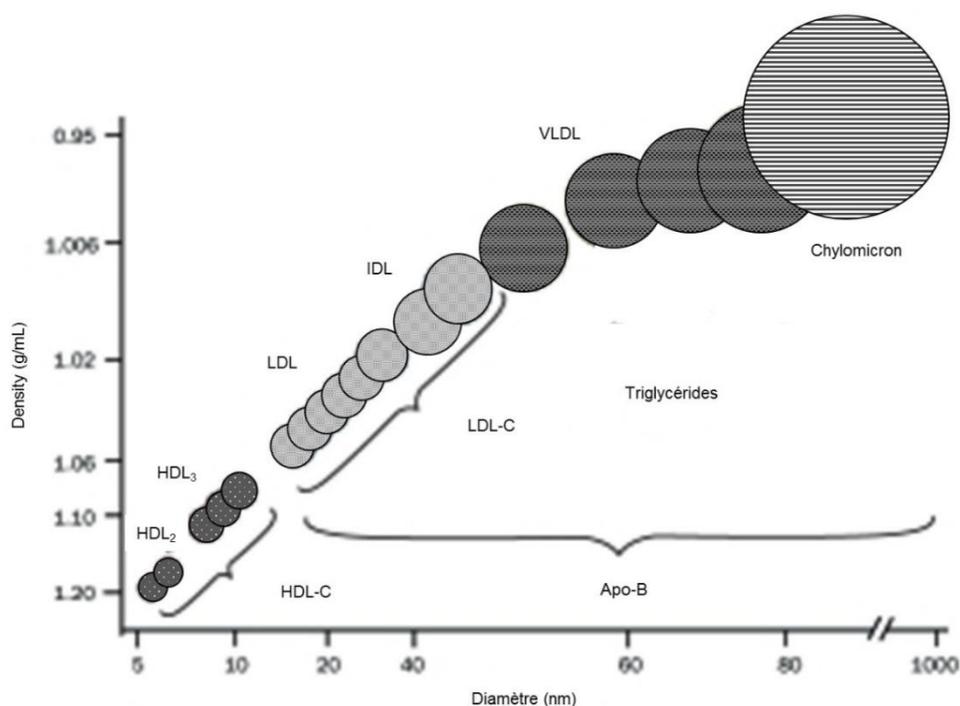


Figure 5 Représentation graphique des différentes sous-classes de lipoprotéines
Figure adaptée de *Mayo Clinic Proceeding* (80)

L'identification de ces différentes sous-classes peut être effectuée par une migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide de la fraction LDL, préalablement séparée des autres classes majeures de lipoprotéines par ultracentrifugation (79, 81). Il est aussi possible d'effectuer cette migration à partir d'un échantillon de plasma

total. La photographie d'un gel utilisé pour évaluer la taille des particules LDL d'un individu est présentée à la **Figure 6**. Il est possible de déterminer la proportion relative des sous-espèces de particules en considérant l'intensité de la bande et la distance de migration. Les numéros (1, 2, 3 et 4) sur la figure permettent de bien identifier l'intensité du signal à chacune des tailles respectives. Il est à noter que cette méthode pionnière dans l'identification de la taille des particules est de moins en moins utilisée et que de nouvelles techniques de laboratoire, mettant à profit les mêmes propriétés des LDL, permettent d'effectuer ces mesures de manière plus rapide, mais souvent aussi plus onéreuse.

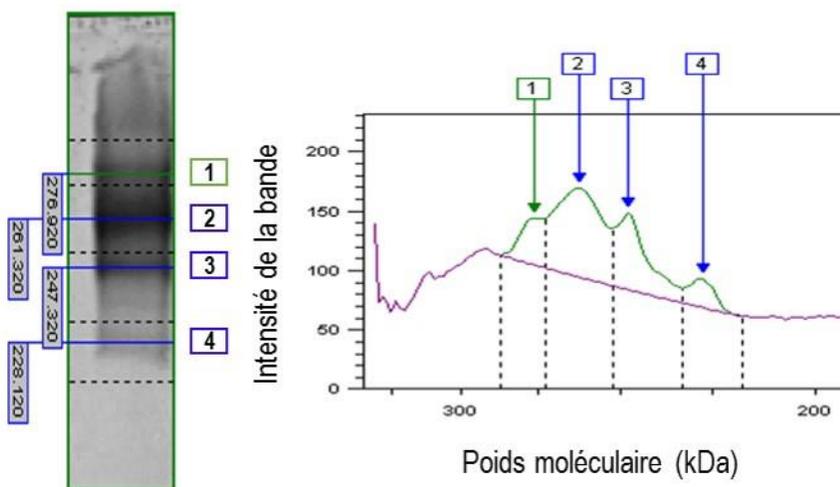


Figure 6 Détermination de la taille des particules LDL

Au-delà des variations en densité, des différences au niveau des caractéristiques physicochimiques de ces lipoprotéines sont aussi observables. Le potentiel athérogène des particules LDL varierait entre autres selon chacune de ces sous-classes, celui-ci étant plus élevé pour les sdLDL. Ainsi, même si les sdLDL contiennent une faible quantité de cholestérol et qu'ils ne sont pas nécessairement associés à une élévation des niveaux de LDL-C, un profil lipidique caractérisé par une prédominance de ces petites particules est associé à une augmentation du risque de MCV de deux à trois fois, comparativement à un profil ayant majoritairement de plus grosses particules (10, 82-84). Certaines études ont observé que cette augmentation semblerait même être indépendante des autres facteurs de risque habituellement associés au développement de MCV (81). Toutefois, la relation indépendante entre les particules LDL de petite taille et le risque de MCV n'a pas été observée dans toutes les études sur le sujet et ce sujet est donc controversé.

D'ailleurs, de plus en plus d'études démontrent que les différences entre les propriétés physicochimiques de ces sdLDL auraient une influence importante sur les mécanismes sous-jacents au développement de

l'athérosclérose (85). Des changements au niveau de la surface de la particule ont été proposés pour expliquer le caractère athérogène des sdLDL. Ces changements pourraient altérer l'affinité de liaison entre la particule et son récepteur et donc, augmenter son temps de résidence vasculaire et réduire l'efficacité de son catabolisme (86). De surcroît, la plus petite taille des particules pourrait permettre une plus grande perméabilité au niveau de l'endothélium artériel et faciliter la formation de la plaque (87).

De plus, des études *in vitro* ont démontré que les sdLDL s'oxydent plus facilement que les particules plus grosses (88, 89). L'oxydation des LDL est d'ailleurs un facteur amplifiant le risque de MCV et le développement de l'athérosclérose (90). Finalement, ces petites particules pourraient favoriser la synthèse de thromboxane, associée aux événements coronariens aigus, par l'activation de l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus (91, 92).

5.1 Déterminants de la taille des particules LDL

La distribution de la taille des LDL serait à la fois la conséquence d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (84, 93, 94). D'une part, la présence de sdLDL de manière prédominante est plus commune chez l'homme que chez la femme, tout comme la proportion de ces petites particules semble augmenter avec l'âge (95). L'estrogène pourrait avoir un effet bénéfique sur la vitesse de catabolisme des sdLDL, diminuant ainsi leur temps de résidence causant une atténuation des effets athérogènes de ces particules (96). D'autre part, une influence génétique substantielle sur le phénotype de la taille des particules LDL a été démontrée par Austin et al dans le cadre d'une étude faite sur des jumeaux (94). Une récente étude démontre d'ailleurs une association entre la présence de sdLDL et un variant génétique de la protéine convertase subtilisin/kexin de type 7 (PCSK7) (84). Bien que le rôle physiologique de cette enzyme ne soit pas totalement encore identifié, il semblerait que celle-ci soit impliquée dans la régulation des rLDL (84). Or, d'autres études sont encore nécessaires afin d'identifier avec certitude les déterminants génétiques associés à la production accrue de sdLDL.

Du point de vue métabolique, une grande proportion de sdLDL pourrait aussi être causée par leur temps de résidence plasmatique plus grand comparativement aux plus grosses particules, et ce, étant donné leur plus faible affinité avec les récepteurs cellulaires (97). En second lieu, des études de cinétique ont aussi démontré que les sdLDL découlant de la cascade métabolique endogène classique proviendraient de VLDL de plus faible densité et de plus grande taille (98). Ces grosses particules VLDL seraient, au départ, sécrétées de manière plus abondante en situation d'hypertriglycéridémie et d'insulino-résistance (41, 95, 99, 100). D'ailleurs, de nombreuses évidences démontrent que les niveaux de TG plasmatiques seraient le facteur le plus étroitement associé à un profil lipidique caractérisé par une prédominance de sdLDL, et ce, en considérant tous les déterminants associés aux petites particules LDL (12, 93, 94). Un individu qui présente donc plusieurs facteurs

de risque serait encore plus susceptible de présenter une prédominance de sdLDL. Ceci concorde avec la plupart des études démontrant une forte corrélation entre des taux élevés de sdLDL avec les autres facteurs de risque conventionnels des MCV. D'ailleurs, la présence de comorbidités, tel que le diabète, favoriserait aussi la présence de particules de petites tailles (84). Ainsi, certaines études associent aussi un profil cardiovasculaire à risque à des concentrations élevées de sdLDL, c'est-à-dire que des niveaux élevés de cholestérol total, d'apoB et de LDL-C ont été associés à une prédominance de sdLDL (95, 101). Or, étant donné une absence de corrélation, aucune estimation de la taille moyenne des particules LDL ne peut être effectuée à l'aide d'un ratio entre la concentration de LDL-C et les niveaux plasmatiques d'apo-B100 (102).

Il semble donc clair que la taille des particules LDL est d'origine multifactorielle et qu'une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent l'apparition de ce phénotype à caractère athérogène permettra de mieux comprendre ce facteur de risque d'un point de vue physiologique et possiblement son rôle dans l'athérosclérose.

Chapitre 6. Nombre de particules LDL et MCV

Tout comme la taille des particules LDL varie d'un individu à un autre, le nombre circulant de ces particules aussi est inconstant, et ce, même pour des niveaux de LDL-C identiques. Toutefois, puisque qu'il a été démontré que chaque particule VLDL synthétisée possède une copie unique de l'apo-B100 et que cette dernière demeure sur la lipoprotéine pendant tout le parcours métabolique jusqu'à la disparition de celle-ci de la circulation sanguine, il est possible de connaître le nombre de ces particules en circulation en évaluant la concentration plasmatique de cette protéine. Cette liaison covalente entre l'apo-B100 et les diverses lipoprotéines riches en TG est indépendante de la grosseur de la lipoprotéine et de son contenu en cholestérol (103). Ainsi, l'évaluation des concentrations en apo-B100 donne de l'information sur le nombre de particules athérogènes en circulation et donc, sur le nombre de lipoprotéines ayant la capacité de s'infiltrer au niveau des parois artérielles et potentiellement de causer des lésions athérosclérotiques (104).

Ainsi, la détermination de la concentration d'apo-B100 est maintenant proposée afin de définir le risque de MCV (80, 105). Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que la détermination des niveaux circulants d'apo-B100 pourrait être utilisée préférentiellement au LDL-C dans l'évaluation du risque cardiovasculaire (30-33). Somme toute, il semblerait que le nombre de lipoprotéines athérogènes en circulation, mesuré par la concentration d'apo-B100 plasmatique, prédirait mieux le développement de MCV que la quantité de cholestérol contenu dans ces lipoprotéines et les lipoprotéines non-HDL (106-108). Effectivement, le nombre de lipoprotéines athérogènes nous informe directement sur la quantité de particules pouvant se loger à l'intérieur des parois vasculaires et causer des complications (109, 110). Cette méthode d'évaluation du risque fournit donc des informations supplémentaires comparativement aux concentrations de LDL-C, particulièrement lors d'un profil lipidique caractérisé par une prépondérance de petites particules qui contiennent peu de cholestérol (111).

Grâce à des méthodes d'ultracentrifugation, il est possible de séparer les fractions des différentes lipoprotéines et de déterminer spécifiquement le LDL-apoB en circulation en évaluant la concentration d'apo-B100 dans cette fraction particulière. Évidemment, cette technique demande des analyses en laboratoire considérables comparativement à l'analyse de la concentration totale d'apo-B100, ce qui limite son application. De plus, considérant que les LDL représentent 90% de l'apo-B100 en circulation en situation de jeûne et que la majorité des particules associées à une apo-B100 sont athérogènes, la détermination spécifique du LDL-apoB en situation de dépistage de routine n'est peut-être pas justifiée (112). Il est à noter qu'il est aussi possible d'utiliser des méthodes directes, telle que la résonance magnétique nucléaire, afin d'évaluer le LDL-apoB (113). Toutefois, dans le cadre de cette étude, l'évaluation du LDL-apoB permet de comparer adéquatement les déterminants métaboliques impliqués dans l'élévation des niveaux de LDL-C, de LDL-apoB et sdLDL, tous des phénotypes associés à un risque cardiovasculaire élevé.

6.1 Déterminants du nombre de particules LDL

Tout comme la taille, le LDL-apoB est influencé par des paramètres non modifiables tels que l'âge et le sexe des individus. Les hommes sont donc à plus haut risque de posséder des concentrations élevées d'apo-B100, risque qui augmente aussi avec l'âge de l'individu (114). Certaines mutations génétiques ont aussi été associées à des modifications par rapport à la régulation des niveaux de cholestérol, en augmentant la production endogène de cholestérol ou en diminuant l'élimination des particules riches en cholestérol de la circulation sanguine, comme c'est le cas pour l'hypercholestérolémie familiale (115, 116). En plus de ces facteurs de risque non modifiables, des facteurs de risque modifiables modulent aussi le LDL-apoB. Ainsi, l'alimentation, l'activité physique et l'utilisation de statines pourraient aussi avoir un effet bénéfique sur les niveaux d'apo-B100 (63).

Encore une fois, au niveau métabolique, une augmentation de la concentration plasmatique de LDL-apoB peut à la fois être causée par une plus grande production de ces particules ou par une élimination déficiente de celles-ci, causant un temps de résidence des particules circulantes plus élevé. À ce sujet, les données d'études de cinétique sont partagées par rapport à l'origine de l'augmentation du LDL-apoB entre une hyperproduction et une diminution de la vitesse d'élimination de ces particules. La majorité des études supportent l'hypothèse selon laquelle une production accrue de particules LDL serait la cause principale de l'observation de niveaux de LDL-apoB élevés (117, 118). À l'inverse, une quantité tout de même appréciable d'études trouvent une relation plus importante entre le catabolisme ralenti des LDL et une concentration circulante de ces particules élevée (72, 119). L'étude par Gaw et al. utilisait l'iode comme traceur, comparativement à la D3-leucine pour les autres études présentées (72, 117-119). Il est tout de même peu probable que cette différence méthodologique explique les divergences de conclusions observées à travers ces études. Entre autres, une étude de cinétique démontre que les effets bénéfiques sur la diminution des niveaux de LDL-apoB de la diète méditerranéenne pourraient être attribuables principalement à une augmentation de la vitesse d'élimination des particules LDL (64).

La mise en commun de ces évidences suggère une combinaison des deux paramètres de cinétique dans la variation du LDL-apoB circulantes. D'ailleurs, une étude de Zheng et al. démontre que les concentrations en apoB au niveau des fractions lipoprotéiques riches en TG serait à la fois dépendantes du taux de production et de catabolisme de ces particules (56).

Vu les discordances sur l'origine métabolique des concentrations accrues de LDL-apoB et l'importance démontrée du nombre de particules athérogènes en circulation, il importe de mieux comprendre les causes de ce dérèglement, et ce, dans un but éventuel de prévention plus efficace.

Chapitre 7. Mise en contexte des différents projets de cinétique

7.1 Méthodologie

La présente étude regroupe l'analyse de la mise en commun de données de cinétique de l'apo-B100 chez 181 sujets ayant participé à différentes études réalisées à l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels de l'Université Laval.

7.1.1 Sujets

Toutes les données utilisées dans le cadre de cette étude proviennent de projets antérieurs, pour lesquels les participants n'ont été soumis à aucun traitement nutritionnel ou thérapeutique. Les participants, pour être admissibles, devaient répondre aux critères d'admission spécifiques à chaque projet (120-130). Aucun participant ne devait être traité avec des médicaments affectant le métabolisme des lipides.

7.1.2 Protocoles de cinétiques

Tous les protocoles de cinétiques de l'apo-B100 ont été effectués selon un marquage endogène avec la D3-leucine. Parmi les onze études considérées dans cette analyse, les participants de 9 études étaient nourris pendant la cinétique.

Tableau I Composition en macronutriments des galettes de cinétiques fournies dans les conditions «faible en gras» et «riche en gras»

| | % de l'apport calorique quotidien | |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | Condition «faible en gras» | Condition «riche en gras» |
| Glucides | 62.7 | 44.0 |
| Lipides | 22.4 | 41.1 |
| Saturés | 3.6 | 6.0 |
| Monoinsaturés | 11.0 | 25.1 |
| Polyinsaturés | 5.6 | 7.6 |
| Protéines | 16.1 | 15.4 |

Le protocole de la cinétique débutait après un jeûne de 12h avec la consommation de repas, sous forme de galettes, représentant 1/30 de leur apport calorique quotidien à chaque trente minutes pendant la durée totale de la cinétique (15 heures), pour un total de 30 galettes. Après 3 heures suivant l'ingestion de la première galette, les participants recevaient la D3-leucine sous forme d'un bolus suivi d'une injection constante pendant

la durée totale de la cinétique. Des prélèvements sanguins (12) étaient ensuite effectués à des heures fixes, dépendantes des protocoles de chacune des études. La composition en macronutriments des galettes fournies variait selon les différentes études. La **Figure 7**, illustre un exemple de protocole de cinétique, pendant lequel les participants étaient nourris. Le moment des prélèvements est indiqué par chacune des seringues au-dessus de la ligne de temps. Sur ce schéma, l'infusion de D3-leucine débute au temps = 0h. Les participants devaient consommer leurs repas à tous les 0,5h, dès le temps = -3h, et ce, pour la durée totale de la cinétique. Ainsi, trois études ont été effectuées dans des conditions «faibles en gras» (120, 121, 129), alors que six études ont été effectuées dans des conditions «riches en gras» (122, 124-127, 131). Les compositions en macronutriments détaillées sont présentées dans le **Tableau I**.

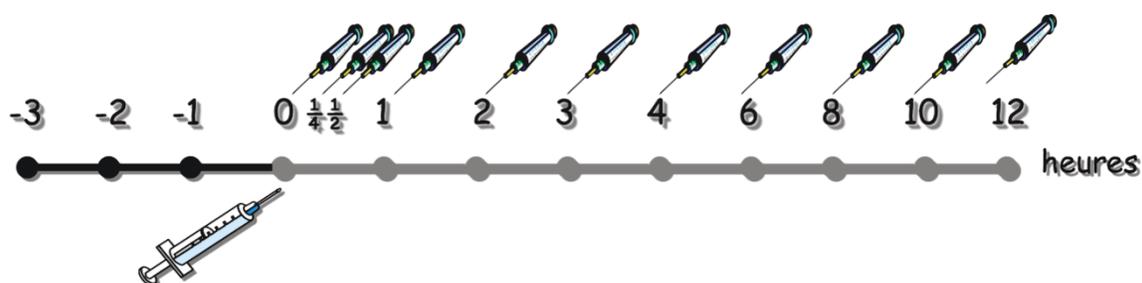


Figure 7 Représentation schématique d'un protocole de cinétique

Les cinétiques des deux dernières études utilisées dans le cadre de cette analyse ont été effectuées alors que les participants étaient à jeun pendant la durée totale de la cinétique. L'injection de D3-leucine était sous la forme d'un bolus pour la première étude (128), alors que les participants de la seconde étude recevaient un bolus suivi d'une infusion constante de D3-leucine pendant la durée totale de la cinétique (130). Les prélèvements sanguins et les analyses de laboratoire étaient effectués de la même manière pour toutes les études. Les différences entre les protocoles de cinétique de chacune des études ont été considérées lors de la modélisation. Toutefois, il est suggéré que les différences entre les paramètres de cinétique générés à partir d'une infusion de type bolus ou de type infusion constante, sont mineures (119).

Un tableau résumant les différents protocoles de cinétique de chacune des études incluses dans les analyses statistiques est présenté à la page suivante (**Tableau 2**).

Tableau 2 Description des études incluses dans l'étude selon les différents protocoles de cinétique

| Description de l'étude | Participants | | Protocole de cinétique | | | |
|--|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|----------------|----------|
| | Hommes | Femmes | Type d'infusion | Condition nutritionnelle | | |
| Effets différentiels de l'atorvastatine ou du fénofibrate sur le profil lipidique et les caractéristiques électrophorétiques des LDL chez des sujets diabétiques ayant une hypertriglycéridémie modérée. | 11 | 0 | Bolus/Infusion constante | Riche en gras | | |
| Rôle du récepteur LDL dans le métabolisme de l'apoB | 14 | 2 | Bolus/Infusion constante | Riche en gras | | |
| Effets métaboliques d'une diète pauvre ou très pauvre en graisses et riche en glucides complexes comparés à ceux d'une diète riche en gras monoinsaturés chez l'homme obèse. | 19 | 0 | Bolus/Infusion constante | Faible en gras | | |
| Effet de l'ezetimibe sur la cinétique des apolipoprotéines B-48 et B-100 chez les hommes avec hypercholestérolémie primaire | 8 | 0 | Bolus/Infusion constante | Riche en gras | | |
| Consommation de lait et syndrome métabolique chez la femme ménopausée | 0 | 9 | Bolus/Infusion constante | Riche en gras | | |
| Étude de la lipase endothéliale et de son rôle dans le métabolisme des lipoprotéines | 0 | 20 | Bolus/Infusion constante | Faible en gras | | |
| Caractérisation de la composition et du métabolisme des HDL chez les sujets ayant une déficience en lipase hépatique. | 9 | 5 | Bolus/Infusion constante | À jeun | | |
| Évaluation de l'impact de la diète méditerranéenne sur les facteurs de risque cardiovasculaire et évaluation de l'interaction entre les effets de la diète et la perte de poids. | 19 | 0 | Bolus | À jeun | | |
| Étude des relations entre la cinétique de l'apoprotéine B-48 et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme intestinal des lipides chez des sujets atteints du syndrome métabolique | 30 | 0 | Bolus/Infusion constante | Riche en gras | | |
| Effets d'une diète portfolio faible ou riche en acides gras monoinsaturés sur l'hypercholestérolémie. | 14 | 5 | Bolus/Infusion constante | Faible en gras | | |
| Effet de l'ezetimibe et de la simvastatin sur le métabolisme de l'apolipoprotéine B chez les hommes atteints d'hyperlipidémie. | 16 | 0 | Bolus/Infusion constante | Riche en gras | | |
| Total | 140 | 41 | Bolus | 1 | À jeun | 2 |
| | | | Bolus/Infusion constante | 10 | Faible en gras | 3 |
| | | | | | Riche en gras | 6 |

7.2 Objectif et hypothèses

Les travaux ayant mené à la rédaction de ce mémoire avaient pour objectif principal de mieux comprendre les mécanismes métaboliques sous-jacents à l'apparition de phénotypes athérogènes au niveau des particules LDL.

7.2.1 Objectif spécifique

Évaluer et comparer entre eux les déterminants métaboliques à l'origine d'une augmentation de la proportion de sdLDL, de LDL-apoB et de niveaux de LDL-C élevés, dans un grand échantillon d'hommes et de femmes.

7.2.2 Hypothèses

Les voies métaboliques menant à des phénotypes de taille réduite et à une augmentation du nombre de particules LDL seraient distinctes.

Plus spécifiquement :

- i) **La taille des LDL est principalement déterminée par la vitesse de renouvellement des particules VLDL.**
- ii) **Le nombre de particules LDL dépend en majeure partie du taux d'élimination des particules LDL en circulation.**

Chapitre 8. Interrelation entre le métabolisme *In vivo* de l'apolipoprotéine B-100, la taille et le nombre des particules LDL

Inter-relationship Between the *In vivo* Metabolism of Apolipoprotein B100-Containing Lipoproteins and LDL Particle Size and LDL Particle Number

Myriam Leclerc¹, Esther M Ooi², Janie Allaire¹, Jean-Philippe Drouin-Chartier¹, Caroline Richard¹, Marie-Eve Labonté¹, Sophie Desroches¹, Johanne Marin¹, André J Tremblay¹, Patrick Couture¹ and Benoît Lamarche¹

¹ Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Quebec City, Quebec, Canada.

² Medicine and Pharmacology RPH Unit, University of Western Australia, United States.

Cet article est présentement en révision par les co-auteurs.

Résumé

Objectif: L'objectif principal de la présente étude était d'investiguer l'interrelation entre la cinétique de lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine (apo) B-100 et différents phénotypes des particules LDL, incluant la taille (LDLsi), le nombre de particules (LDL-apoB) et les concentrations de cholestérol (LDL-C).

Méthodes: Cette analyse est basée sur des données provenant de 181 sujets masculins et féminins, chez qui la cinétique avait préalablement été investiguée à l'aide d'un marquage endogène de l'apo-B100 avec de la leucine deutérée (D3-leucine). La taille des particules LDL a été évaluée par électrophorèse sur gradient de gel en polyacrylamide en conditions non-dénaturantes.

Résultats : L'âge moyen des participants (\pm ET) était de $44,0 \pm 12,3$ ans. L'indice de masse corporelle (BMI) et les niveaux de triglycérides (TG) étaient $28,7 \pm 4,7$ kg/m² et $2,00 \pm 1,70$ mmol/l respectivement. Aucune association n'a été trouvée entre la LDLsi et le LDL-apoB ($r=0,00$, $P=0,44$) ou avec les concentrations de LDL-C ($r=0,11$, $P=0,15$). La LDLsi a principalement été associée avec le taux fractionnel catabolique des VLDL apo-B100 (FCR, $r=0,28$, $P<0,01$). Les niveaux de LDLapo-B100 corrélaient positivement avec le taux de production (PR) des VLDL et LDL apo-B100 ($0,34 < r < 0,47$, $P<0,01$) et négativement avec le FCR de LDLapo-B100 ($r=0,54$, $P<0,01$). Les niveaux de LDL-C corrélaient avec le FCR de LDL-apo-B100 ($r=0,56$, $P<0,01$). Dans des régressions multiple de type pas à pas, le sexe, les niveaux plasmatiques de TG et l'âge étaient identifiés comme prédicteurs indépendants de la LDLsi, alors que le PR, le FCR de LDL-apo-B100, le statut nutritionnel pendant la cinétique et l'âge étaient les variables corrélant le plus fortement avec les niveaux de LDL-apo-B100.

Conclusion : Ces résultats indiquent que la taille et le nombre des particules LDL possèdent des origines métaboliques différentes, supportant la notion qu'ils devraient être considérés comme étant des phénotypes des LDL distincts.

Abstract

Objective: The objective of the present study was to investigate the inter-relationship between the in vivo kinetics of apolipoprotein (apo) B100-containing lipoproteins and various features of LDL, including size (LDLsi), particle number (LDL-apoB-100) and cholesterol concentrations (LDL-C).

Methods: This analysis is based on data from 181 male and female subjects among whom in vivo lipoprotein kinetics were investigated using endogenous labeling of apoB-100 with D3-leucine. LDLsi was assessed by non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis.

Results: Participants' mean age (\pm SD) was 44.0 ± 12.3 yrs. Mean body mass index (BMI) and triglyceride (TG) levels were 28.7 ± 4.7 kg/m² and 2.00 ± 1.70 mmol/l, respectively. LDLsi showed no association with LDL-apoB-100 ($r=0.00$, $P=0.44$) or with LDL-C concentrations ($r=0.11$, $P=0.15$). LDLsi was primarily associated with VLDL apoB-100 fractional catabolic rate (FCR, $r=0.28$, $P<0.01$). LDLapoB-100 levels correlated positively with VLDL and LDL apoB100 production rate (PR, $0.34 < r < 0.47$, $P<0.01$) and negatively with LDLapoB-100 FCR ($r=-0.54$, $P<0.01$). LDL-C levels correlated primarily with LDLapoB-100 FCR ($r=-0.56$, $P<0.01$). In multiple regression analyses, sex, plasma TG levels and age were independent correlates of variations in LDLsi while LDLapoB-100 PR, LDLapoB-100 FCR, feeding status during the kinetic studies and age were the strongest correlates of variations in LDLapoB-100 levels.

Conclusion: These results indicate that LDL particle size and number have different metabolic origins, supporting the notion that they should be considered as distinct LDL phenotypes.

Introduction

Reducing plasma LDL-C concentrations through lifestyle changes and pharmacotherapy with statin is the primary target of coronary heart disease (CHD) prevention in most guidelines around the world¹. This is consistent with unequivocal evidence from large clinical trials having shown that lowering LDL-C concentrations by the use of statin may reduce the risk of CHD by approximately 30% in a variety of low risk and high risk patients². However, there is also evidence indicating that a large proportion of patients who will develop CHD have normal LDL-C concentrations.³⁻⁵ Fasting plasma apolipoprotein (apo)B concentration has been suggested as a more precise marker of CHD risk based on the concept that it provides information on the number of VLDL and LDL atherogenic particles in the circulation⁶. Accordingly, relative risk reduction across 7 major placebo-controlled statin trials was more closely related to reductions in apoB than to reductions in either non-HDL-C or LDL-C⁷. However, this is not a unanimously accepted concept⁸.

Although the cholesterol carried by LDL is intimately involved in atherogenesis, the diversity and heterogeneity within LDL populations in terms of size, density and charge has long been recognized.^{9, 10} Preponderance of small and dense LDL (sdLDL) has been associated with an increased risk of CHD.¹¹⁻¹³ The increased atherogenicity of sdLDL particles compared with large LDL has been attributed in part to their increased binding affinity for vascular wall proteoglycans, reduced affinity for the LDL receptor leading to increased residence time in plasma and increased susceptibility to in vitro oxidation¹⁴. It is currently improbable that sdLDL are an independent risk factor for CHD and this is partly due to the fact that they most often co-segregate with several other cardiometabolic features of metabolic syndrome such as low HDL-C, high TG and a pro-inflammatory profile¹⁵. However, the lack of correlation between LDL-C concentrations and sdLDL suggest that these two measures may represent fairly distinct features of LDL¹⁵.

In vivo studies with stable isotopes have proven to be extremely informative in describing the in vivo kinetics of lipoproteins in humans^{16, 17}. Surprisingly, very few studies have compared the metabolic origins of increased LDL-C, increased LDL particle number and reduced LDL particle size using data from in vivo kinetic studies. Taking advantage of kinetic data from several studies conducted in our laboratory, we have compared the metabolic determinants of the various features of LDL in a large sample of men and women. We hypothesized that LDL particle size is primarily determined by the rate of VLDL turnover while LDL particle number is primarily determined by the rate of LDL clearance.

Methods

Subjects

Data from a sample of 181 (140 males and 41 females) from 11 previous kinetic studies in our laboratory have been compiled for the purpose of this study. All subjects included in this analysis had available apoB-100 containing lipoprotein kinetic data, as well as measures of LDL-C and LDLapoB-100 concentrations and of LDL particle size (LDLsi). Only data from untreated participants in the various studies were used in this analysis. Thus, subjects were either on no particular treatment¹⁸⁻²³, a control diet²⁴⁻²⁶ or on a placebo of a drug study^{27, 28}.

Characterization of Plasma Lipids

In all studies, blood samples were collected after a 12-hour fast in Vacutainer tubes containing 0.1% EDTA and used to assess plasma lipid levels including LDL-C and LDLapoB-100 concentrations. Plasma apoB concentrations were measured by using a Behring Nephelometer BN-100 analyzer (Behring Diagnostics) with reagents and calibrators (Dade Behring) provided by the manufacturer. LDL particle size was assessed in whole plasma or serum sample using nondenaturing polyacrylamide 2-16% gradient gel electrophoresis.²⁹ LDLsi was defined as the most prominent LDL subfraction in each individual²⁹. Lipoprotein fractions (VLDL-IDL-LDL) were separated from blood samples obtained during the kinetic by sequential ultracentrifugation as described in the various published studies^{19-28, 30, 31}. ApoB concentrations in the various subfractions were determined using a noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay (Alercheck, Portland, ME).

In vivo Apolipoprotein B100 Kinetics

In vivo lipoprotein kinetics were investigated using a bolus of D3-leucine in the fasting state (1 study)²⁵ or using a constant primed infusion of L-[5,5,5-D3] leucine in the fasting state (1 study)²² or in the fed state (9 studies): 3 studies were in low fat condition (22.4% fat)^{19, 21, 26} and 6 studies were in high fat condition (41.1% fat)^{20, 23, 24, 27, 28, 30, 31}. In the fasting state study, subjects received a bolus or a constant primed infusion of the tracer and blood samples were taken over the subsequent 12-hour period as well as during the next 4 days in the morning in the fasting state. In the fed-state studies, subjects consumed small half-hourly snacks over a 15-hour period, in order to meet their daily energy requirements, estimated with the Harris-Benedict equation³². After three hours of constant feeding, subjects received a primed constant infusion of the tracer over the next 12 hours. Blood samples were taken at various time points during that period.

ApoB-100 kinetic parameters were obtained by multicompartamental modeling of the isotopic enrichment data in the various fractions over time using the SAAM II program (SAAM Institute, Seattle, WA) as described previously

19-28, 30, 31. Models were slightly adapted to take into account the nature of the kinetic studies (bolus vs. primed constant infusion). All modeling procedures from the previous studies were revisited to ensure consistent analysis and interpretation of data. Enrichment data of VLDL, IDL and LDL were modeled concurrently.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SAS (v9.3, Cary). Data were checked for normality and transformed when required. Pearson correlation coefficient were calculated to evaluate the association between different LDL features and apo-B100 kinetic parameters. Multivariate correlates of variations in LDL_{si}, LDL_{apo-B100} and LDL-C levels were investigated using stepwise multiple regression analyses. Statistical significance was defined as $\alpha \leq 0.05$.

Results

Physical characteristics and cardiometabolic risk profile of the 140 men and 41 women are shown in Table 1. Participants were aged 17 to 67 years, were overweight as well as abdominally obese as a group. Fasting plasma TG levels were borderline high and slightly higher among men than among women. Three subjects had complete hepatic lipase (HL) deficiency (two males, one female), 8 subjects were heterozygotes for familial hypercholesterolemia (FH), 3 subjects were homozygotes for FH and 2 subjects had type III dyslipidemia, one of which was also heterozygote for FH.

As shown in Figure 1, plasma LDLapoB-100 concentrations were significantly correlated with LDL-C levels ($r=0.45$, $P<0.001$) but showed no association with LDLsi ($r=0.00$, $P=0.44$). Table 2 presents the crude as well as sex, age, BMI and feeding status-adjusted univariate correlations between the various LDL features and apoB-100 kinetic variables. In adjusted analyses, variations in LDLsi were primarily correlated with VLDLapoB-100 FCR ($r=0.28$, $P<0.01$). Variations in LDLapoB-100 concentrations were positively correlated with VLDLapoB-100, IDLapoB-100 and LDLapoB-100 PRs ($0.25<r<0.47$, $P<0.01$) as well as inversely with LDLapoB-100 FCR ($r=-0.54$, $P<0.01$). Variations in LDL-C concentrations correlated primarily with LDLapoB-100 FCR ($r=-0.56$, $P<0.01$). Figure 2 is a radar plot illustrating differences in the associations between LDL-C levels, LDLsi, LDL apoB-100 concentrations and apoB-100-containing kinetics. Fasting plasma TG is a strong correlate of variations in LDLsi ($r=-0.32$, $P<0.01$, data not shown). However, data revealed that the correlates of LDLsi and LDLapoB-100 and LDL-C concentrations were not affected when subjects were divided according to their plasma TG concentrations (above or below 1.7 mmol/l, data not shown).

In stepwise multivariate analysis (Table 3), variations in the kinetics of apoB 100 containing lipoproteins showed no association with LDLsi, which was primarily correlated with sex, plasma TG levels and age. Variations in LDLapoB-100 PR and FCR, feeding status of the kinetic study (fasting vs. fed) and age were the most significant correlates of variations in LDLapoB-100 concentrations. Finally, variations in LDLapoB-100 PR and FCR, VLDLapoB-100 FCR and age were most strongly correlated with variations in LDL-C concentrations. Sensitivity analyses excluding all subjects with any form of genetic metabolic disorders had no impact on the results (data not shown).

Discussion

To our knowledge, this is the first study indicating that increased LDL particle number and reduced LDL particle size are distinct phenotypes with different metabolic origins. sdLDL are predicted by reduced clearance of VLDLapoB-100 particles, although this association is no longer significant when adjusted for age, sex and plasma TG concentrations. On the other hand, elevated plasma LDLapoB-100 and LDL-C levels appear to share similar metabolic origins, with LDL PR (positive association) and FCR (negative association) as primary determinants. The large sample of subjects included in this analysis makes the results quite robust.

Determinants of LDL particles size

Previous studies using tracers have suggested that subjects with predominantly sdLDL had slower clearance of VLDLapoB-100, higher PR of small VLDLapoB-100, as well as reduced FCR of LDLapoB-100 than those with large LDL particles³³. This is partly consistent with the results from the present study, where VLDLapoB-100 FCR was one of the dominant features predicting LDL_{si}, where a faster clearance of VLDL being associated with larger LDL particles. VLDLapoB-100 PR was also positively correlated with LDL_{si} in our study but this association was no longer significant after adjustment for obesity status, sex and age (Table 2). Zheng et al. have shown that VLDL containing apoC-III but not apoE are the major source of LDL particles through rapid conversion in plasma³⁴. They have also suggested that the shift from large LDL to sdLDL seen in hypertriglyceridemia occur through the following metabolic pathways: increased production of both apoC-III containing VLDL and sdLDL by the liver, increased conversion from large LDL to sdLDL, and reduced clearance of sdLDL¹⁴. Unlike in the studies by Packard et al. and Zheng et al, we did not find any association between LDLapoB-100 FCR and LDL_{si}^{14, 33}. This can be attributed to a number of factors. Subjects in the present study covered a much wider spectrum of plasma lipid levels, including plasma TG, which ranged from very low to high levels. This is an important consideration as plasma TG levels are not only a significant correlate of LDL_{si} but also of LDLapoB-100 FCR in previous studies³³. It must be also stressed that the metabolism of apoB-100 containing lipoprotein in previous studies was compared between subjects with larger vs. smaller LDL whereas our study is based on univariate and multivariate correlations^{14, 33}.

Thus, our data cannot rule out the possibility that LDLapoB-100 FCR is an important determinant of LDL_{si}, or vice versa. Data from various studies are quite consistent in demonstrating that a lower rate of catabolism/conversion of VLDL into LDL is a key factor influencing the accumulation of sdLDL ref?. However, we showed for the first time that this association is not independent of concurrent variations in plasma TG concentrations in multivariate analyses. These results suggest that other TG-dependent metabolic pathways

may be involved. In that regard, cholesteryl ester transfer protein (CETP) plays a key role in the formation of sdLDL, particularly in hypertriglyceridemic individuals, by catalyzing the hetero-exchange of TG and cholesteryl esters between VLDL and LDL. The CETP-mediated enrichment of LDL with TG may yield particles that are more prone to being hydrolysed by hepatic lipase and perhaps endothelial lipase as well^{15, 35}. Thus, a combination of high plasma TG concentrations, high CETP activity and high lipase activities are key factors in the modulation of LDL_{si}, and this may be partly independent of the rate at which VLDL are cleared from the circulation.

Determinants of LDL particle number

Unsurprisingly, our results indicated that LDL particle number is determined primarily by variations in LDL_{apoB-100} production and clearance rates. This is consistent with data from Teng and al.³⁶ who have shown that both LDL_{apoB-100} FCR and PR predicted the high levels of LDL_{apoB-100} seen in patients with familial hypercholesterolemia. On the other hand, a number of studies have identified either LDL_{apoB-100} PR³⁶⁻³⁸ or FCR as the primary determinant of LDL particle number.^{33, 39} Our large sample size may have allowed us to identify correlations that may have been missed in previous studies based on much smaller sample sizes.

Age has been positively associated with increased LDL_{apoB-100} concentrations, particularly among women.⁴⁰ Interestingly, the associations between LDL_{apoB-100} PR and FCR and LDL particle number and LDL-C concentrations were independent of concurrent variations in age, sex, weight status as well as plasma TG concentrations. This is consistent with the very proximal influence of LDL production and clearance in influencing the accumulation of LDL particles in the circulation.

Unlike LDL_{si}, plasma LDL-C and LDL_{apoB-100} concentrations appeared to be under the influence of similar metabolic pathways, which is consistent with data from previous studies.^{33, 37, 39} This may also suggest that LDL-C and LDL_{apoB-100} levels may have concordant CHD predictive value. However, being under the influence of similar pathways does not imply similar associations with CHD risk. We and others have shown that apoB and LDL-C levels provide often discordant information regarding the risk of CHD^{6, 41, 42}. Data also suggest that changes in apoB levels may be more predictive than changes in LDL-C levels in predicting statin-induced cardiovascular benefits⁷.

Our study has strengths and limitations that need to be acknowledged. First and foremost, this is the largest compilation of data from kinetic studies in humans, allowing us to identify weak associations that may have been missed in previous smaller scale metabolic studies. Subjects included in this analysis cover a wide range of

cardiometabolic features, which we believe is also a strength. Data from the various studies were modeled in a systematic and comparable way, making the analysis more robust. Although one protocol was based on a bolus of D3-leucine rather than a primed constant infusion, data suggest very minor differences in kinetic data generated by either methods.³³ Levels of apoC-III in the various lipoprotein fractions would have provided further insightful information on the role of this important apolipoprotein in determining LDLsi and particle number.

Conclusion

Data from this large sample of individuals indicate that LDLsi and LDL particles number are under the influence of different metabolic pathways and should therefore be considered as distinct LDL phenotypes. LDLsi may be primarily determined by variations in the rate of VLDL catabolism and even more by variations in plasma TG concentrations. LDL particle number is primarily determined by variations in LDL production and clearance rates. Further studies are needed to clarify the role of each of these two distinct features of LDL as risk factors for CHD.

List of abbreviations

Apo: apolipoprotein
CETP: cholesteryl ester transfer protein
CHD : coronary heart disease
D3-leucine : deuterated leucine
FCR : fractional catabolic rate
FH: familial hypercholesterolemia
HL: hepatic lipase
LDL-apoB : LDL particle number
LDL-C : LDL cholesterol
LDLsi : LDL size
PR : production rate
sdLDL: small and dense LDL
TG : triglyceride

Acknowledgements

We thank the nurses and laboratory staff at INAF for their technical assistance and for the expert care provided to the participants. We also express our gratitude to the study participants, without whom the study would not have been possible.

References

1. Hennessy DA, Bushnik T, Manuel DG, Anderson TJ. Comparing guidelines for statin treatment in Canada and the United States. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4
2. Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, Moore TH, Burke M, Davey Smith G, Ward K, Ebrahim S. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;1:CD004816
3. Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Skinner B, Teng B, Kwiterovich PO. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77:604-608
4. Avogaro P, Bittolo Bon G, Avogaro P, Cazzolato G, Quinci GB. Are apolipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis? *The Lancet*. 313:901-903
5. Sniderman AD, Jungner I, Holme I, Aastveit A, Walldius G. Errors that result from using the tc/hdl c ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *Journal of Internal Medicine*. 2006;259:455-461
6. Sniderman AD, Lamarche B, Contois JH, de Graaf J. Discordance analysis and the Gordian knot of LDL and non-HDL cholesterol versus apoB. *Current Opinion in Lipidology*. 2014;25:461-467
7. Thanassoulis G, Williams K, Ye K, Brook R, Couture P, Lawler PR, de Graaf J, Furberg CD, Sniderman A. Relations of change in plasma levels of LDL-C, non-HDL-C and apoB with risk reduction from statin therapy: A meta-analysis of randomized trials. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3:e000759
8. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;302:1993-2000
9. Adams GH, Schumaker VN. Polydispersity of human low-density lipoproteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1969;164:130-146
10. Kholodova YD, Harris WS. Identification and characteristic of LDL-subfractions in human plasma. *Ukrainskii biokhimičeskii žurnal (1978)*. 1995;67:60-65
11. Phillips CM, Perry IJ. Lipoprotein particle subclass profiles among metabolically healthy and unhealthy obese and non-obese adults: Does size matter? *Atherosclerosis*. 2015;242:399-406
12. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1988;260:1917-1921
13. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*. 1997;95:69-75
14. Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation*. 2010;121:1722-1734

15. Lamarche B, Lemieux I, Despres JP. The small, dense ldl phenotype and the risk of coronary heart disease: Epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes & metabolism*. 1999;25:199-211
16. Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Thematic review series: Patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *Journal of lipid research*. 2006;47:1607-1619
17. Parhofer KG, Barrett PH. Thematic review series: Patient-oriented research. What we have learned about vldl and ldl metabolism from human kinetics studies. *Journal of lipid research*. 2006;47:1620-1630
18. Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Differential effect of atorvastatin and fenofibrate on plasma oxidized low-density lipoprotein, inflammation markers, and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57:380-386
19. Desroches S, Ruel IL, Deshaies Y, Paradis ME, Archer WR, Couture P, Bergeron N, Lamarche B. Kinetics of plasma apolipoprotein c-iii as a determinant of diet-induced changes in plasma triglyceride levels. *European Journal of Clinical Nutrition* 2008;62:10-17
20. Tremblay AJ, Lamarche B, Cohn JS, Hogue JC, Couture P. Effect of ezetimibe on the in vivo kinetics of apob-48 and apo-B100 in men with primary hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:1101-1106
21. Paradis ME, Hogue MO, Mauger JF, Couillard C, Couture P, Bergeron N, Lamarche B. Visceral adipose tissue accumulation, secretory phospholipase a2-ii-a and atherogenicity of ldl. *International Journal of Obesity*. 2006;30:1615-1622
22. Ruel IL, Couture P, Cohn JS, Lamarche B. Plasma metabolism of apob-containing lipoproteins in patients with hepatic lipase deficiency. *Atherosclerosis*. 2005;180:355-366
23. Couture P, Tremblay AJ, Kelly I, Lemelin V, Droit A, Lamarche B. Key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism are downregulated in dyslipidemic men with insulin resistance. *Journal of lipid research*. 2014;55:128-137
24. Drouin-Chartier JP, Gagnon J, Labonte ME, Desroches S, Charest A, Grenier G, Dodin S, Lemieux S, Couture P, Lamarche B. Impact of milk consumption on cardiometabolic risk in postmenopausal women with abdominal obesity. *Nutrition journal*. 2015;14:12
25. Richard C, Couture P, Desroches S, Lichtenstein AH, Lamarche B. Effect of weight loss, independent of change in diet composition, on apolipoprotein ai kinetic in men with metabolic syndrome. *Journal of lipid research*. 2013;54:232-237
26. Labonte ME, Jenkins DJ, Lewis GF, Chiavaroli L, Wong JM, Kendall CW, Hogue JC, Couture P, Lamarche B. Adding mufa to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods reduces apoai fractional catabolic rate in subjects with dyslipidaemia. *The British journal of nutrition*. 2013;110:426-436
27. Tremblay AJ, Lamarche B, Hogue JC, Couture P. Effects of ezetimibe and simvastatin on apolipoprotein b metabolism in males with mixed hyperlipidemia. *Journal of lipid research*. 2009;50:1463-1471
28. Tremblay AJ, Lamarche B, Ruel IL, Hogue JC, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Increased production of vldl apo-B100 in subjects with familial hypercholesterolemia carrying the same null ldl receptor gene mutation. *Journal of lipid research*. 2004;45:866-872

29. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres 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
30. Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Evidence of increased secretion of apolipoprotein b-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of lipid research*. 2007;48:1336-1342
31. Hogue JC, Lamarche B, Deshaies Y, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P. 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: clinical and experimental*. 2008;57:246-254
32. Harris JA, Benedict FG. A biometric study of human basal metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1918;4:370-373
33. 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. *Journal of lipid research*. 2000;41:305-318
34. Zheng C, Khoo C, Ikewaki K, Sacks FM. Rapid turnover of apolipoprotein c-iii-containing triglyceride-rich lipoproteins contributing to the formation of ldl subfractions. *Journal of lipid research*. 2007;48:1190-1203
35. Paradis ME, Lamarche B. Endothelial lipase: Its role in cardiovascular disease. *The Canadian journal of cardiology*. 2006;22 Suppl B:31b-34b
36. 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. *The Journal of Clinical Investigation* 1986;77:663-672
37. Gaw A, Packard CJ, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Lorimer AR, Shepherd J. Overproduction of small very low density lipoproteins (sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: Relationships between apolipoprotein b kinetics and plasma lipoproteins. *Journal of lipid research*. 1995;36:158-171
38. Kesaniemi YA, Grundy SM. Significance of low density lipoprotein production in the regulations of plasma cholesterol level in man. *The Journal of Clinical Investigation* 1982;70:13-22
39. Welty FK, Lichtenstein AH, Barrett PH, Dolnikowski GG, Schaefer EJ. Human apolipoprotein (apo) b-48 and apo-B100 kinetics with stable isotopes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19:2966-2974
40. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Cohn SD, Schaefer MM, Ordovas JM, Castelli WP, Wilson PW. Effects of age, gender, and menopausal status on plasma low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein b levels in the framingham offspring study. *Journal of lipid research*. 1994;35:779-792
41. Sniderman AD, St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Despres JP, Lamarche B. Concordance/discordance between plasma apolipoprotein b levels and the cholesterol indexes of atherosclerotic risk. *The American journal of cardiology*. 2003;91:1173-1177
42. Sniderman AD, Islam S, Yusuf S, McQueen MJ. Discordance analysis of apolipoprotein b and non-high density lipoprotein cholesterol as markers of cardiovascular risk in the interheart study. *Atherosclerosis*. 2012;225:444-449

Tables and figures

Table 1. Baseline Characteristics and Fasting Lipid Profile of the 181 Participants

| | Mean \pm SD | | |
|------------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| | All subjects N=181 | Males N=140 | Females N=41 |
| Age, y | 44.0 \pm 12.3 | 42.0 \pm 11.7 | 51.2 \pm 12.0 |
| Weight, kg | 84.4 \pm 16.6 | 88.7 \pm 15.0 | 69.5 \pm 12.6 |
| Body mass index, kg/m ² | 28.7 \pm 4.7 | 29.1 \pm 4.7 | 27.2 \pm 4.4 |
| Waist circumference, cm * | 100.0 \pm 13.8 | 104.5 \pm 11.3 | 88.4 \pm 13.1 |
| Systolic blood pressure, mm Hg ** | 118.0 \pm 13.1 | 121.0 \pm 12.4 | 111.0 \pm 12.2 |
| Diastolic blood pressure, mm Hg ** | 75.3 \pm 10.1 | 77.5 \pm 10.2 | 70.2 \pm 7.7 |
| Total-C, mmol/L | 5.62 \pm 1.82 | 5.59 \pm 1.64 | 5.73 \pm 2.36 |
| LDL-C, mmol/L | 3.71 \pm 1.63 | 3.67 \pm 1.39 | 3.85 \pm 2.30 |
| HDL-C, mmol/L | 1.11 \pm 0.31 | 1.04 \pm 0.23 | 1.36 \pm 0.39 |
| Triglyceride, mmol/L | 2.00 \pm 1.70 | 2.15 \pm 1.83 | 1.49 \pm 1.01 |
| Fasting glucose, mmol/L § | 5.45 \pm 1.16 | 5.56 \pm 1.25 | 5.10 \pm 0.63 |

BMI indicates body mass index; C, cholesterol, LDL, low-density lipoproteins, HDL, high density lipoproteins.

* data only available for 140 subjects

** data only available for 130 subjects

§ data only available for 172 subjects

Table 2. Unadjusted and Adjusted Pearson Correlation Between the Kinetics of Apo-B-100-Containing Lipoproteins and various LDL features

| Variables | LDLsi | | LDL-C | | LDL-apoB-100 | |
|-----------------------------|------------|----------|------------|----------|--------------|----------|
| | Unadjusted | Adjusted | Unadjusted | Adjusted | Unadjusted | Adjusted |
| VLDL apoB-100 | | | | | | |
| Production rate | 0.21 ** | 0.12 | 0.21 ** | 0.18 * | 0.35 ** | 0.34 ** |
| Fractional catabolic rate § | 0.42 ** | 0.28 ** | 0.00 | -0.07 | -0.11 | -0.13 |
| VLDL direct catabolism | -0.09 | -0.03 | 0.09 | 0.12 | -0.06 | -0.05 |
| VLDL-LDL direct conversion | 0.05 | 0.06 | 0.01 | -0.01 | 0.09 | 0.08 |
| IDL apoB-100 | | | | | | |
| Production rate | 0.18 * | 0.03 | 0.03 | 0.00 | 0.25 ** | 0.25 ** |
| Fractional catabolic rate § | 0.18 * | 0.16 | -0.08 | -0.16 * | -0.05 | -0.09 |
| LDL apoB-100 | | | | | | |
| Production rate § | 0.14 | 0.08 | 0.10 | 0.05 | 0.48 ** | 0.47 ** |
| Fractional catabolic rate § | 0.09 | -0.02 | -0.51 ** | -0.56 ** | -0.53 ** | -0.54 ** |

VLDL direct catabolism reflects the percentage of VLDL apoB direct clearance and VLDL-LDL direct conversion reflects the percentage of VLDL directly converted to LDL.

* P<0.05

** P<0.01

§ Analysis performed on log-transformed values

Covariables in adjusted correlations were age, BMI, sex and feeding status during the kinetic study

Table 3. Stepwise multiple regression analysis of predictors of various LDL features

| Dependent variable | Independent variables | Standardized coefficient β | % variation | P |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------|--------|
| LDL size | Sex | -0.42 | 19.2 | <.0001 |
| | TG levels | -0.32 | 12.4 | <.0001 |
| | Age | -0.17 | 2.4 | 0.01 |
| LDL-apoB-100 § | LDL PR | 0.90 | 62.1 | <.0001 |
| | LDL FCR | -0.93 | 27.8 | <.0001 |
| | Feeding status during kinetic | -0.10 | 0.6 | 0.0006 |
| | Age | -0.07 | 0.5 | 0.003 |
| LDL-C | LDL FCR | -0.78 | 26.1 | <.0001 |
| | LDL PR | 0.35 | 12.9 | <.0001 |
| | VLDL FCR | 0.20 | 3.9 | 0.0006 |
| | Age | -0.15 | 2.1 | 0.01 |

Analyses presented here are based on the PROC REG procedure.

Age, sex, body mass index, VLDL-apoB-100 PR, IDL-apoB-100 PR§, LDL-apoB-100 PR§, VLDL-apoB-100 FCR§, IDL-apoB-100 FCR§, LDL-apoB-100 FCR§, TG levels§ and feeding status during the kinetic studies were included in the model.

§ Analysis performed on log-transformed values

Table 4. Nutrient facts of kinetic meals in the low fat and high fat condition. (Supplemental)

| | % of kcal | |
|-----------------|-------------------|--------------------|
| | Low fat condition | High fat condition |
| Carbohydrates | 62.7 | 44.0 |
| Lipids | 22.4 | 41.1 |
| Saturated | 3.6 | 6.0 |
| Monounsaturated | 11.0 | 25.1 |
| Polyunsaturated | 5.6 | 7.6 |
| Protein | 16.1 | 15.4 |

Values were determined with Nutrific® and are based on the 2010 Canadian Nutrient File

Figure I. Association Between LDL-C, LDL apoB-100 and LDL size (adjusted for age, body mass index and sex)

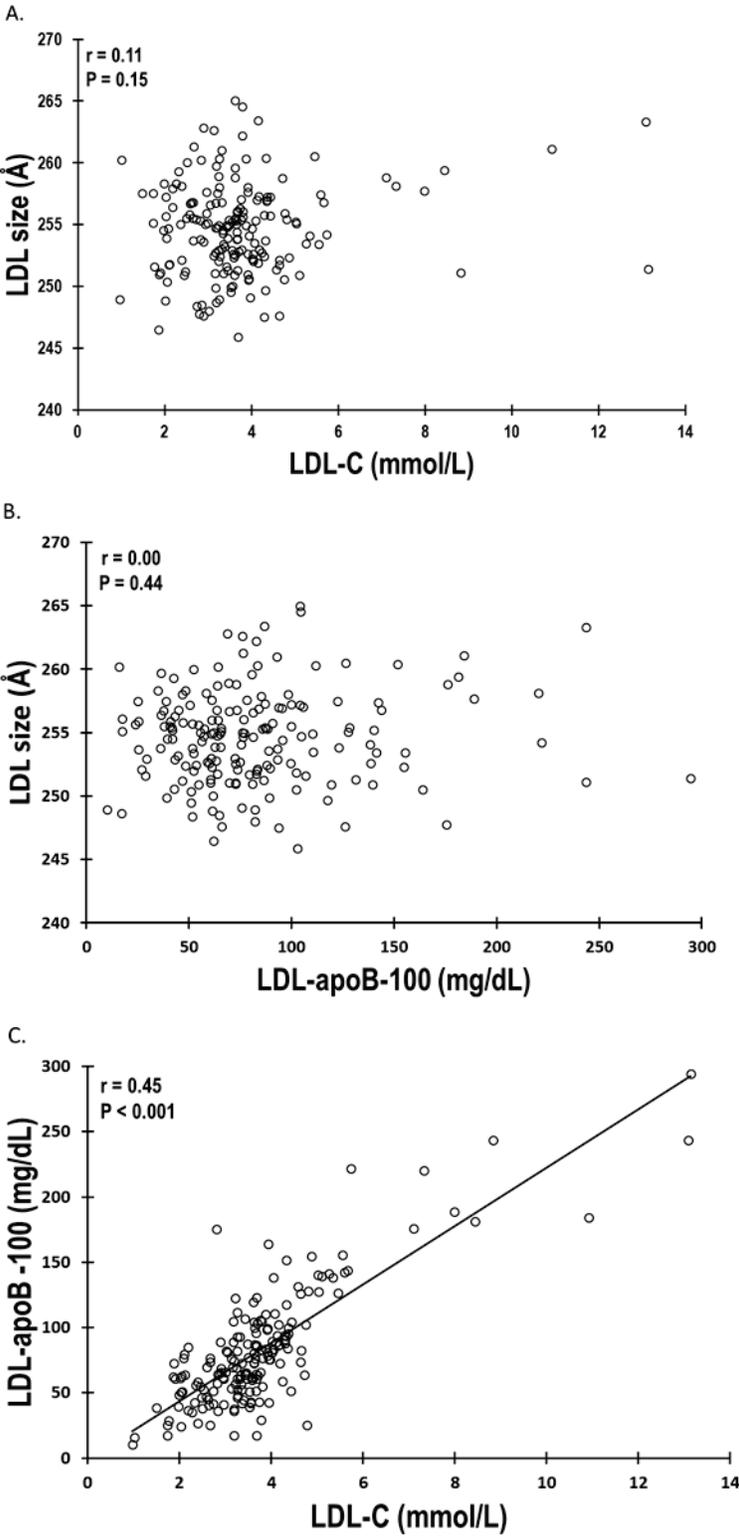


Figure II. Radar Chart of Adjusted Correlations Between the Kinetics of ApoB-Containing Lipoproteins and various LDL features

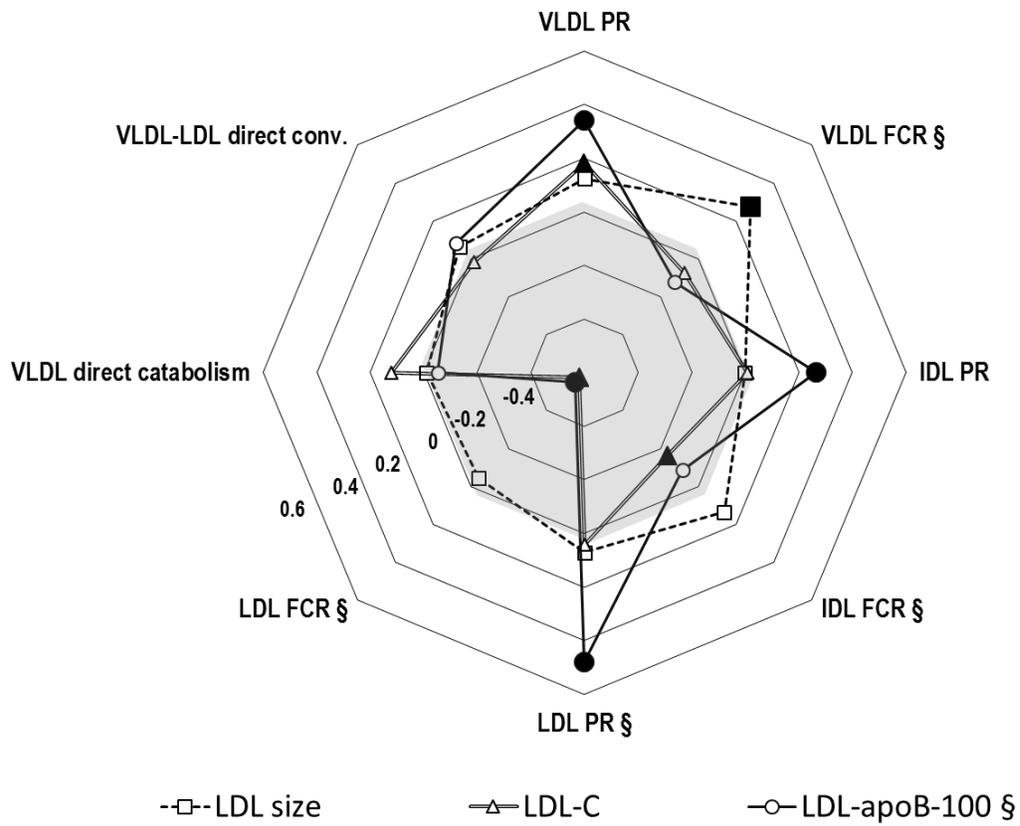


Diagram shows significant at $\alpha=0.05$ adjusted† correlation with filled marker and r value for LDL particle size, LDL cholesterol concentration and number of LDL apoB with apoB-100-containing lipoprotein kinetics, PR, production rate; FCR, fractional catabolic rate. VLDL direct catabolism and VLDL-LDL direct conversion. are in percentage of pool size and represent the percentage of VLDL apoB direct clearance and the percentage of VLDL directly converted to LDL (bypassing IDL).

§ Analysis performed on log-transformed values

† Correlation adjusted for age, BMI, sex and feeding nature of kinetic study

Discussion générale et conclusion

L'étude présentée dans ce mémoire avait pour objectif d'évaluer et de comparer entre eux les déterminants métaboliques à l'origine d'une augmentation de LDL-apoB, d'une réduction de la taille de ces particules et de niveaux élevés de LDL-C, dans un grand échantillon d'hommes et de femmes. Nous avons posé les hypothèses suivantes :

- i) La taille des LDL est principalement déterminée par la vitesse de renouvellement des particules VLDL.
- ii) Le nombre de particules LDL dépend en majeure partie du taux d'élimination des particules LDL en circulation.

Les données démontrent premièrement qu'il n'y a aucune corrélation entre les deux phénotypes évalués, confirmant que la taille et le nombre de particules LDL sont deux caractéristiques distinctes des LDL. L'évaluation des déterminants métaboliques menant à des concentrations élevées de sdLDL, de LDL-apoB et de LDL-C nous a aussi permis de soutenir cette affirmation. Effectivement, la voie métabolique menant à une augmentation du nombre de LDL-apoB semblerait être distincte de celle menant à une diminution de la taille de ces particules, alors que le nombre de particules et les niveaux de LDL-C partageraient une origine métabolique semblable.

Cette étude a permis de mettre en évidence la contribution majeure des taux de production et de catabolisme des LDL comme déterminants du nombre de particules LDL et des niveaux de LDL-C. Bien que ces résultats ne soient pas très surprenants, étant donné que de nombreuses études avaient préalablement identifié l'un ou l'autre de ces déterminants métaboliques comme prédicteur du nombre de particules, cette étude a permis de démontrer l'importance simultanée de chacun des deux facteurs.

À l'inverse, les résultats indiquent que les sdLDL seraient en majeure partie déterminés par l'élimination des particules VLDL. Toutefois, l'âge, le sexe et les niveaux de TG plasmatiques s'avèrent les variables les plus fortement corrélées à la taille des LDL. En effet, les effets observés entre le FCR des VLDL et la présence de sdLDL ne sont plus statistiquement significatifs après l'incorporation de ces derniers facteurs dans les analyses. Ces données permettent tout de même de confirmer notre hypothèse de départ, suggérant une influence principale du taux de renouvellement des VLDL sur l'origine métabolique de la détermination de la taille des particules.

Dans le contexte actuel, où la prévalence des MCV ne cesse d'augmenter malgré les efforts mis au niveau de leur prévention, la pertinence de cette étude est évidente et permet de mettre en exergue les différences entre

les différents phénotypes des LDL. Effectivement, l'étude présentée dans ce mémoire fait clairement la démonstration que les origines métaboliques de la taille des particules LDL, ainsi que du nombre de particules et des niveaux de LDL-C sont différentes et reflètent des particularités distinctes des LDL.

De plus, cette étude comporte évidemment des forces et des faiblesses qui méritent d'être reconnues. Premièrement, elle est la première étude de cette envergure, à présenter en parallèle les déterminants métaboliques responsables de la prédominance de sdLDL et d'une concentration de élevée LDL-*apoB*. Le grand nombre de sujets inclus dans cette présente étude apporte de la puissance aux analyses statistiques et de la robustesse aux associations trouvées. D'ailleurs, la présence d'associations demeurant statistiquement significatives, et ce, en incluant ou en excluant les participants souffrant d'hypercholestérolémie familiale, de déficience en lipase hépatique et/ou de dyslipidémie de type III démontre bien la force de ces associations.

Deuxièmement, l'étude était basée sur des données de sujets, hommes et femmes, n'ayant reçu aucun traitement et provenant de plusieurs études de cinétique antérieures. Elle permettait donc de décrire le métabolisme des lipides dans des conditions qui reflétaient de manière assez juste «la vie réelle», sans interférence de la part d'un traitement quelconque. Par contre, de par le protocole de cette étude, les données recueillies provenaient de plusieurs études antérieures, chacune ayant des critères d'inclusion et d'exclusion spécifiques. Toutefois, tous les sujets inclus dans la présente étude ne devaient pas suivre de traitements affectant le métabolisme des lipides. Il est donc possible de supposer que ces différences, entre les critères de sélection, n'auront pas affecté de manière significative l'objectif principal de l'étude. Nous pensons aussi que le nombre appréciable de participants dans l'échantillon permettait d'obtenir des données de la part de sujets qui couvraient un large éventail de conditions métaboliques, ce qui apporte de la robustesse à nos résultats.

Des différences à l'intérieur des protocoles de cinétique étaient aussi observables. Toutefois, tel que mentionné précédemment, des données suggèrent que l'utilisation d'un bolus ou d'une infusion constante comme mode d'administration du marqueur n'affecte pas de manière significative la détermination des paramètres de cinétique, comme le PR et le FCR (119). Il est à noter que les analyses statistiques ont aussi été effectuées en excluant les deux études pendant lesquelles les participants étaient à jeun durant le moment de la cinétique. Les associations trouvées restaient, encore une fois, les mêmes. Donc, il est plausible de penser que ni le mode d'infusion de la D3-leucine, ni le statut nutritionnel pendant la cinétique, n'auront influencé les résultats et les conclusions de la présente étude.

Il est à noter que les données présentées dans cette étude sont des associations et donc, elles ne peuvent pas servir afin d'établir un lien de cause à effet. Toutefois, cela ne faisait pas partie de l'objectif de cette étude, qui visait principalement à décrire les facteurs métaboliques associées à différents phénotypes de LDL. La pertinence de ces données reste évidente en nous informant, entre autres, sur les cibles métaboliques

potentielles pouvant faire l'objet d'études d'interventions futures. De plus, considérant que la banque de données utilisée pour cette étude est, à ce jour, la plus grande recensée dans le cadre d'études de cinétiques, la force des associations démontrées demeure considérable.

En conclusion, la pertinence de cette étude se situe principalement au niveau d'une meilleure compréhension des voies métaboliques pouvant mener à l'apparition de MCV. Effectivement, en clinique, la mesure seule de ces marqueurs reste pertinente, mais l'élaboration de cibles thérapeutiques visant l'amélioration de ceux-ci pourrait grandement faciliter la lutte aux MCV. Dans cette optique, la compréhension des mécanismes métaboliques sous-jacents à l'apparition de ces phénotypes athérogènes est essentielle. L'étude présentée dans ce mémoire, sur les principaux facteurs métaboliques en lien avec la diminution de la taille et l'augmentation du nombre des particules LDL, comparativement à un profil lipidique plus sain, permet donc d'établir des bases essentielles à l'élaboration d'une telle stratégie préventive.

Bibliographie

1. Ly A. Cancers et autres maladies non transmissibles : vers une approche intégrée de santé publique. *Journal Africain du Cancer* 2012;4(3):137-9.
2. Daigle J-M. Les maladies du cœur et les maladies vasculaires cérébrales : Prévalence, morbidité et mortalité au Québec Institut national de santé publique du Québec 2006.
3. Ni H, Coady S, Rosamond W, Folsom AR, Chambless L, Russell SD, Sorlie PD. Trends from 1987 to 2004 in sudden death due to coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *American heart journal* 2009;157(1):46-52.
4. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine* 2009;122(1 Suppl):S3-s14.
5. Jonas A. Lipoprotein structure. Edition ed. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 2002:483-504.
6. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89(5):2462-78.
7. Leopold JA, Loscalzo J. Clinical Importance of Understanding Vascular Biology. *Cardiology in Review* 2000;8(2):115-23.
8. Thorin-Trescases N, Voghel G, Farhat N, Drouin A, Gendron M-È, Thorin É. Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Medecine sciences : M/S* 2010;26(10):875-80.
9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74. doi: 10.1038/nature01323.
10. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III2-7.
11. Sniderman AD, Furberg CD, van Lennep JER, Jungner I, Walldius G. Lipoproteins and cardiovascular risk. *The Lancet* 2003;361(9373):1989.
12. Tobe SW, Stone JA, Brouwers M, Bhattacharyya O, Walker KM, Dawes M, Genest J, Jr., Grover S, Gubitz G, Lau D, et al. Harmonization of guidelines for the prevention and treatment of cardiovascular disease: the C-CHANGE Initiative. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2011;183(15):E1135-50.
13. Cooney MT, Dudina AL, Graham IM. Value and limitations of existing scores for the assessment of cardiovascular risk: a review for clinicians. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54(14):1209-27.
14. Ebrahim S, Taylor F, Ward K, Beswick A, Burke M, Davey Smith G. Multiple risk factor interventions for primary prevention of coronary heart disease. *The Cochrane database of systematic reviews* 2011(1):Cd001561.
15. Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, Creager MA, Culebras A, Eckel RH, Hart RG, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2011;42(2):517-84.
16. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: A critical review of the evidence. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2003;290(7):932-40.
17. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Archives of internal medicine* 1997;157(21):2413-46.
18. Walldius G, Jungner I. Is there a better marker of cardiovascular risk than LDL cholesterol? Apolipoproteins B and A-I – new risk factors and targets for therapy. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2007;17(8):565-71.
19. McPherson R, Frohlich J, Fodor G, Genest J, Canadian Cardiovascular S. Canadian Cardiovascular Society position statement--recommendations for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *The Canadian journal of cardiology* 2006;22(11):913-27.

20. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, Greenland P, Lackland DT, Levy D, O'Donnell CJ, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014;129(25 Suppl 2):S49-73.
21. Anderson TJ, Grégoire J, Hegele RA, Couture P, Mancini GBJ, McPherson R, Francis GA, Poirier P, Lau DC, Grover S, et al. Are the ACC/AHA Guidelines on the Treatment of Blood Cholesterol a Game Changer? A Perspective From the Canadian Cardiovascular Society Dyslipidemia Panel. *Canadian Journal of Cardiology*;30(4):377-80.
22. Mancini GBJ, Gosselin G, Chow B, Kostuk W, Stone J, Yvorchuk KJ, Abramson BL, Cartier R, Huckell V, Tardif J-C, et al. Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Diagnosis and Management of Stable Ischemic Heart Disease. *Canadian Journal of Cardiology*;30(8):837-49.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 1972;18(6):499-502.
24. Gagné C, Gaudet D. Les dyslipoprotéïnémies : l'approche clinique, 3e édition. 2e éd ed. Sainte-Foy: Centre de recherche sur les maladies lipidiques, Centre hospitalier de l'Université Laval, 2007.
25. McCormick SPA. Lipoprotein(a): Biology and Clinical Importance. *The Clinical Biochemist Reviews* 2004;25(1):69-80.
26. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annual review of pathology* 2006;1:297-329.
27. Takemura Y, Ishida H, Inoue Y. Utilization of common inflammatory markers in new, symptomatic, primary care outpatients based on their cost-effectiveness. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2003;41(5):668-74.
28. Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47(8 Suppl):C19-31.
29. Mohty D, Pibarot P, Despres JP, Cote C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;28(1):187-93.
30. Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Skinner B, Teng B, Kwiterovich PO. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77(1):604-8.
31. Avogaro P, Bittolo Bon G, Avogaro P, Cazzolato G, Quinci GB. Are Apolipoproteins better Discriminators than Lipids for Atherosclerosis? *The Lancet* 1979;313(8122):901-3.
32. Sniderman AD, Jungner I, Holme I, Aastveit A, Walldius G. Errors that result from using the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *Journal of internal medicine* 2006;259(5):455-61.
33. Cromwell WC, Otvos JD, Keyes MJ, Pencina MJ, Sullivan L, Vasan RS, Wilson PWF, D'Agostino RB. LDL particle number and risk of future cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study—Implications for LDL management. *Journal of Clinical Lipidology* 2007;1(6):583-92.

34. Anderson TJ, Gregoire J, Hegele RA, Couture P, Mancini GB, McPherson R, Francis GA, Poirier P, Lau DC, Grover S, et al. 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *The Canadian journal of cardiology* 2013;29(2):151-67.
35. Fukuyama N, Homma K, Wakana N, Kudo K, Suyama A, Ohazama H, Tsuji C, Ishiwata K, Eguchi Y, Nakazawa H, et al. Validation of the Friedewald Equation for Evaluation of Plasma LDL-Cholesterol. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2008;43(1):1-5.
36. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clinical chemistry* 1990;36(1):15-9.
37. Hulley SB, Lo B. Choice and use of blood lipid tests. An epidemiologic perspective. *Archives of internal medicine* 1983;143(4):667-73.
38. Balagopal PB, de Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, McCrindle BW, Mietus-Snyder ML, Steinberger J. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123(23):2749-69.
39. Poss J, Custodis F, Werner C, Weingartner O, Bohm M, Laufs U. Cardiovascular disease and dyslipidemia: beyond LDL. *Current pharmaceutical design* 2011;17(9):861-70.
40. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997;17(12):3542-56.
41. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994;106(2):241-53.
42. Cruz D, Ahmed H, Jones S, Elshazly M, Martin S. Discordance in Lipid Measurements: Can we Capitalize to Better Personalize Cardiovascular Risk Assessment and Treatment? *Current Cardiovascular Risk Report* 2014;8(5):1-8.
43. Miller KW, Small DM. Chapter 1 Structure of triglyceride-rich lipoproteins: an analysis of core and surface phases. Edtion ed. In: Gotto AM, ed. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 1987:1-75.
44. Davis RA. Chapter 14 Lipoprotein structure and secretion. Edtion ed. In: Dennis EV, Jean EV, eds. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 1991:403-26.
45. Davis RA, Vance JE. Chapter 17 - Structure, assembly and secretion of lipoproteins. Edtion ed. In: Dennis EV, Jean EV, eds. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 1996:473-93.
46. Schaefer EJ, Ordovas JM. Metabolism of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. Edtion ed. *Methods in Enzymology*: Academic Press, 1986:420-43.
47. Levine TB, Levine AB. Lipids, Atherogenic Dyslipidemia, and Therapy. Edtion ed. *Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease*: Blackwell Publishing Ltd., 2012:347-408.
48. Saba A, Oridupa O. *Lipoproteins and Cardiovascular Diseases*, 2012.
49. Vance JE. Assembly and secretion of lipoproteins. Edtion ed. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 2002:505-26.
50. Nestel PJ. Chapter 5 The regulation of lipoprotein metabolism. Edtion ed. In: Gotto AM, ed. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 1987:153-82.
51. Fielding PE, Fielding CJ. Chapter 18 - Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system. Edtion ed. In: Dennis EV, Jean EV, eds. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 1996:495-516.
52. Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *Journal of Clinical Investigation* 1985;75(2):384-90.
53. Marcel YL, Hogue M, Weech PK, Davignon J, Milne RW. Expression of apolipoprotein B epitopes in lipoproteins. Relationship to conformation and function. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1988;8(6):832-44.
54. Schneider WJ. Lipoprotein receptors. Edtion ed. *New Comprehensive Biochemistry*: Elsevier, 2002:553-72.

55. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 1987;76(3):504-7.
56. Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation* 2010;121(15):1722-34.
57. Sacks FM. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Current opinion in lipidology* 2015;26(1):56-63.
58. Edtion ed. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, eds. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Boston: Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing, 1990.
59. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJ, Bittner V, Fruchart JC. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *The New England journal of medicine* 2007;357(13):1301-10.
60. Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *Journal of internal medicine* 2008;263(3):256-73.
61. Glickman RM, Magun AM. High-density lipoprotein formation by the intestine. Edtion ed. *Methods in Enzymology*: Academic Press, 1986:519-36.
62. Villard EF, Guerin M. Chapter 4 - Reverse Cholesterol Transport in HDL Metabolism: Modulation of Structural and Functional Features of HDL Particles. Edtion ed. In: Komoda T, ed. *The HDL Handbook (Second Edition)*. Boston: Academic Press, 2014:65-101.
63. Holme I, Hostmark AT, Anderssen SA. ApoB but not LDL-cholesterol is reduced by exercise training in overweight healthy men. Results from the 1-year randomized Oslo Diet and Exercise Study. *Journal of internal medicine* 2007;262(2):235-43.
64. Richard C, Couture P, Ooi EM, Tremblay AJ, Desroches S, Charest A, Lichtenstein AH, Lamarche B. Effect of Mediterranean diet with and without weight loss on apolipoprotein B100 metabolism in men with metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014;34(2):433-8.
65. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of cellular and molecular medicine* 2001;5(4):378-87.
66. Kesaniemi YA, Grundy SM. Significance of low density lipoprotein production in the regulations of plasma cholesterol level in man. *Journal of Clinical Investigation* 1982;70(1):13-22.
67. Sniderman AD, De Graaf J, Couture P, Williams K, Kiss RS, Watts GF. Regulation of plasma LDL: the apoB paradigm. *Clinical science (London, England : 1979)* 2010;118(5):333-9.
68. Fisher WR, Zech LA, Stacpoole PW. ApoB metabolism in familial hypercholesterolemia. Inconsistencies with the LDL receptor paradigm. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1994;14(4):501-10.
69. Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *Journal of lipid research* 2006;47(8):1607-19.
70. Mc FA. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 1958;182(4627):53.
71. Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H. Safety of stable isotope use. *European journal of pediatrics* 1997;156 Suppl 1:S12-7.
72. Welty FK, Lichtenstein AH, Barrett PH, Dolnikowski GG, Schaefer EJ. Human apolipoprotein (Apo) B-48 and ApoB-100 kinetics with stable isotopes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999;19(12):2966-74.
73. Schaefer JR, Rader DJ, Brewer HBJ. Investigation of lipoprotein kinetics using endogenous labeling with stable isotopes. *Current opinion in lipidology* 1992;3(3):227-32.

74. 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. *Journal of Clinical Investigation* 1990;85(3):804-11.
75. CHAN Dick C, BARRETT PHugh R, WATTS Gerald F. Lipoprotein transport in the metabolic syndrome: methodological aspects of stable isotope kinetic studies. *Clinical Science* 2004;107(3):221-32. doi: 10.1042/cs20040108.
76. Boren J, Taskinen MR, Adiels M. Kinetic studies to investigate lipoprotein metabolism. *Journal of internal medicine* 2012;271(2):166-73.
77. Lichtenstein AH, Cohn JS, Hachey DL, Millar JS, Ordovas JM, Schaefer EJ. Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics. *Journal of lipid research* 1990;31(9):1693-701.
78. Barrett PH, Bell BM, Cobelli C, Golde H, Schumitzky A, Vicini P, Foster DM. SAAM II: Simulation, Analysis, and Modeling Software for tracer and pharmacokinetic studies. *Metabolism: clinical and experimental* 1998;47(4):484-92.
79. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *Journal of lipid research* 1982;23(1):97-104.
80. Harper CR, Jacobson TA. Using apolipoprotein B to manage dyslipidemic patients: time for a change? *Mayo Clinic proceedings* 2010;85(5):440-5.
81. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres JP, Lamarche B. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* 2001;104(19):2295-9.
82. Krauss RM. Dietary and genetic effects on low-density lipoprotein heterogeneity. *Annual review of nutrition* 2001;21:283-95.
83. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Mauriege P, Bernard PM, Despres JP, Lamarche B. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005;25(3):553-9.
84. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, Couper D, Virani SS, Kathiresan S, Boerwinkle E, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014;34(5):1069-77.
85. Krauss RM. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Current opinion in lipidology* 1994;5(5):339-49.
86. Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 1998;37(37):12867-74.
87. Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, Wiklund O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* 1996;123(1-2):43-56.
88. de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1991;11(2):298-306.
89. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *The American journal of medicine* 1993;94(4):350-6.
90. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta cardiologica* 2004;59(5):479-84.
91. Weisser B, Locher R, de Graaf J, Moser R, Sachinidis A, Vetter W. Low density lipoprotein subfractions increase thromboxane formation in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1993;192(3):1245-50.

92. Patrono C, Davi G, Ciabattini G. Thromboxane biosynthesis and metabolism in relation to cardiovascular risk factors. *Agents and actions Supplements* 1992;37:10-7.
93. Austin MA. Genetic and environmental influences on LDL subclass phenotypes. *Clinical genetics* 1994;46(1 Spec No):64-70.
94. Austin MA, Newman B, Selby JV, Edwards K, Mayer EJ, Krauss RM. Genetics of LDL subclass phenotypes in women twins. Concordance, heritability, and commingling analysis. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1993;13(5):687-95.
95. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1987;7(5):483-90.
96. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997;82(12):3955-63.
97. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of lipid research* 2001;42(9):1346-67.
98. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal of lipid research* 2002;43(9):1363-79.
99. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Hakkinen A, Olofsson SO, Yki-Jarvinen H, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49(4):755-65.
100. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1992;12(11):1284-90.
101. Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW, Castelli WP, Schaefer EJ. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1992;12(12):1410-9.
102. Furuya D, Yagihashi A, Nasu S, Endoh T, Nakamura T, Kaneko R, Kamagata C, Kobayashi D, Watanabe N. LDL particle size by gradient-gel electrophoresis cannot be estimated by LDL-cholesterol/apolipoprotein B ratios. *Clinical chemistry* 2000;46(8 Pt 1):1202-3.
103. Virmani R, Narula J, Leon MB, Willerson JT. *The Vulnerable Atherosclerotic Plaque: Strategies for Diagnosis and Management*. Wiley, 2008.
104. Packard CJ. Apolipoproteins: the new prognostic indicator? *European Heart Journal Supplements* 2003;5(suppl D):D9-D16.
105. Jacobson TA. Opening a New Lipid "Apo-theary": Incorporating Apolipoproteins as Potential Risk Factors and Treatment Targets to Reduce Cardiovascular Risk. *Mayo Clinic proceedings* 2011;86(8):762-80.
106. Ridker PM, Rifai N, Cook NR, Bradwin G, Buring JE. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005;294(3):326-33.
107. Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. *Circulation* 2005;112(22):3375-83.
108. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Despres JP, Lamarche B. Apolipoprotein-B, low-density lipoprotein cholesterol, and the long-term risk of coronary heart disease in men. *The American journal of cardiology* 2006;97(7):997-1001.
109. Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, Castro Cabezas M, Chapman MJ, Couture P, de Graaf J, Durrington PN, Faergeman O, Frohlich J, et al. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *Journal of internal medicine* 2006;259(3):247-58.
110. Cromwell WC, Barringer TA. Low-density lipoprotein and apolipoprotein B: clinical use in patients with coronary heart disease. *Current cardiology reports* 2009;11(6):468-75.

111. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* (London, England) 2001;358(9298):2026-33.
112. Kovanen PT, Jauhiainen M. Coronary heart disease prediction: Apolipoprotein B shows its might again - but still in vain? *European journal of preventive cardiology* 2015;22(10):1317-20.
113. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinics in laboratory medicine* 2006;26(4):847-70.
114. Sharma R SB, Mahajan M, Kant R. Age and Sex: Important Determinants In Affecting The Levels Of Serum Apolipoprotein B And A1 In Indian Population. *The Internet Journal of Cardiology* 2006;4(number 1).
115. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Barrett PH. Genetic determinants of apolipoprotein B-100 kinetics. *Current opinion in lipidology* 2010;21(2):141-7. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283378e5a.
116. Jensen HK. The molecular genetic basis and diagnosis of familial hypercholesterolemia in Denmark. *Danish medical bulletin* 2002;49(4):318-45.
117. Gaw A, Packard CJ, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Lorimer AR, Shepherd J. Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins. *Journal of lipid research* 1995;36(1):158-71.
118. 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. *Journal of Clinical Investigation* 1986;77(3):663-72.
119. 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. *Journal of lipid research* 2000;41(2):305-18.
120. Desroches S, Ruel IL, Deshaies Y, Paradis ME, Archer WR, Couture P, Bergeron N, Lamarche B. Kinetics of plasma apolipoprotein C-III as a determinant of diet-induced changes in plasma triglyceride levels. *European Journal of Clinical Nutrition* 2008;62(1):10-7.
121. Labonte ME, Jenkins DJ, Lewis GF, Chiavaroli L, Wong JM, Kendall CW, Hogue JC, Couture P, Lamarche B. Adding MUFA to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods reduces apoAII fractional catabolic rate in subjects with dyslipidaemia. *The British journal of nutrition* 2013;110(3):426-36.
122. Tremblay AJ, Lamarche B, Hogue JC, Couture P. Effects of ezetimibe and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in males with mixed hyperlipidemia. *Journal of lipid research* 2009;50(7):1463-71.
123. Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of lipid research* 2007;48(6):1336-42.
124. Couture P, Tremblay AJ, Kelly I, Lemelin V, Droit A, Lamarche B. Key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism are downregulated in dyslipidemic men with insulin resistance. *Journal of lipid research* 2014;55(1):128-37.
125. Tremblay AJ, Lamarche B, Cohn JS, Hogue JC, Couture P. Effect of ezetimibe on the in vivo kinetics of apoB-48 and apoB-100 in men with primary hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26(5):1101-6.
126. Tremblay AJ, Lamarche B, Ruel IL, Hogue JC, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Increased production of VLDL apoB-100 in subjects with familial hypercholesterolemia carrying the same null LDL receptor gene mutation. *Journal of lipid research* 2004;45(5):866-72.
127. Drouin-Chartier JP, Gagnon J, Labonte ME, Desroches S, Charest A, Grenier G, Dodin S, Lemieux S, Couture P, Lamarche B. Impact of milk consumption on cardiometabolic risk in postmenopausal women with abdominal obesity. *Nutrition journal* 2015;14:12.
128. Richard C, Couture P, Desroches S, Lichtenstein AH, Lamarche B. Effect of weight loss, independent of change in diet composition, on apolipoprotein AI kinetic in men with metabolic syndrome. *Journal of lipid research* 2013;54(1):232-7.

129. Paradis ME, Hogue MO, Mauger JF, Couillard C, Couture P, Bergeron N, Lamarche B. Visceral adipose tissue accumulation, secretory phospholipase A2-IIA and atherogenicity of LDL. *International Journal of Obesity* 2006;30(11):1615-22.
130. Ruel IL, Couture P, Cohn JS, Lamarche B. Plasma metabolism of apoB-containing lipoproteins in patients with hepatic lipase deficiency. *Atherosclerosis* 2005;180(2):355-66.
131. Hogue JC, Lamarche B, Deshaies Y, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P. 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: clinical and experimental* 2008;57(2):246-54.