

UNIVERSITE DE NANTES

U.F.R DE MEDECINE

**ETUDE DES EFFETS DE L'INSULINORESISTANCE
ET DES TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES
SUR L'ABSORPTION INTESTINALE ET
LE TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL
CHEZ LE CHIEN**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale de Chimie-Biologie

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité: Nutrition et Métabolisme

présentée et soutenue publiquement par

François BRIAND

le 30 juin 2006, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	Monsieur le Docteur Denis Blache, Dijon Monsieur le Docteur Denis Lairon, Marseille
Examineurs	Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard, Nantes Monsieur le Docteur Didier Junquero, Castres
Directeurs de thèse	Madame le Docteur Khadija Ouguerram, Nantes Monsieur le Professeur Patrick Nguyen, Nantes

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E, Magot T. Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl esters in the dog, a species lacking in cholesteryl esters transfer protein activity. An in vivo approach using stable isotopes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;138:339-45.

Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* 2004;34:527-34.

Briand F, Magot T, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K. Effects of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism in dogs. *Eur J Clin Invest* 2006;36:224-30.

Briand F, Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of high density lipoprotein apolipoprotein A-I and cholesteryl esters in insulin resistant dogs: a stable isotope study. *Diabetes Obes Metab* ; 2007 Jan;9(1):139-42..

Briand F, Serisier S, Krempf M, Magot T, Ouguerram K, Nguyen P. Atorvastatin increases intestinal cholesterol absorption in dog. *J Nutr* 2006; Jul;136(7 Suppl):2034S-2036S.

Serisier S, Briand F, Ouguerram K, Magot T, Nguyen P. Fenofibrate lowers lipid parameters in obese dog. *J Nutr* 2006; Jul;136(7 Suppl):2037S-2040S.

Briand F, Ripoche N, Magot T, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K. Intestinal cholesterol absorption and chylomicron resecretion in obese insulin resistant dogs. Soumis à *Eur J Nutr*.

Briand F, Wulff EM, Ouguerram K, Nguyen P, Larsen MØ. Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lipid metabolism in obese insulin resistant dogs. Soumis à *Eur J Pharmacol*.

Le Gall C, Jacques E, Medjebeur C, Darques L, Briand F, Haddad J, Bleichner G.
Low molecular weight heparin self-injection training: assessment of feasibility, tolerance and economic analysis in emergency departments.
Eur J Emerg Med. 2006 Oct;13(5):264-9.

Communications orales

Briand F, Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Effects of insulin resistance on reverse cholesterol transport, apo A-I kinetics and selective uptake of cholesteryl esters in dog. 23rd annual forum of the American College of Veterinary Internal Medicine. Baltimore, Maryland (USA) - Juin 2005.

Briand F, Nguyen P, Krempf M, Ouguerram K. Effects of atorvastatin on intestinal cholesterol absorption using stable isotope in dog. 23rd annual forum of the American College of Veterinary Internal Medicine. Baltimore, Maryland (USA) - Juin 2005.

Posters

Briand F, Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Effects of insulin resistance on apolipoprotein A-I kinetic and selective uptake in dog. 6th Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology. Washington DC (USA) - Avril 2005.

Briand F, Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Effects of insulin resistance on apolipoprotein A-I kinetic and selective uptake in dog. Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose. Biarritz (France) - Juin 2005.

Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Effects of atorvastatin on HDL-apo A-I kinetics in dog. 2nd International Symposium on Triglycerides and High Density Lipoprotein. New York, New York (USA) - Juillet 2005.

Briand F, Ouguerram K, Krempf M, Nguyen P. Effects of atorvastatin on the intestinal cholesterol absorption in dog. Waltham International Science Symposium. Washington DC (USA) – Septembre 2005

Briand F, Magot T, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K. Intestinal absorption and chylomicron resecretion of dietary cholesterol in obese insulin resistant dogs. Experimental Biology 2006. San Francisco, California (USA) – Avril 2006.

Briand F, Ouguerram K, Krempf M, Nguyen P. Insulin resistance is not associated with glucose intolerance in dog made obese by overfeeding. 24th annual forum of the American College of Veterinary Internal Medicine. Louisville, Kentucky (USA) - Juin 2006.

Prix

Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose. Biarritz (France) - Juin 2005. *Prix poster*.

2nd International Symposium on Triglycerides and High Density Lipoprotein. New York, New York (USA) - Juillet 2005. *Young Investigator Award*.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	9
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	11
INTRODUCTION	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I . Absorption intestinale et transport inverse du cholestérol.....	17
I.1 Absorption intestinale du cholestérol	17
I.1.1 Métabolisme du cholestérol dans la lumière intestinale.....	17
I.1.2 Les récepteurs impliqués dans l'absorption intestinale du cholestérol.....	19
I.1.2.1 Les récepteurs ABC.....	19
ABCG5 & ABCG8	20
ABCA1	21
I.1.2.2 SR-BI.....	21
I.1.2.3 NPC1L1	23
I.1.3 Régulation de l'absorption intestinale du cholestérol.....	24
I.1.3.1 Rôle des enzymes pancréatiques	24
I.1.3.2 Rôle des sels biliaires	25
I.1.3.3 Rôle des récepteurs nucléaires.....	25
I.1.4 Les lipoprotéines intestinales.....	27
I.1.4.1 Les chylomicrons.....	28
Mécanismes d'assemblage des chylomicrons.....	28
Rôle de la MTP dans l'assemblage des chylomicrons.....	32
Rôle de l'ACAT2.....	34
I.1.4.2 Régulation de la sécrétion des chylomicrons	34
I.1.4.3 Mécanismes de sécrétion du cholestérol des chylomicrons	35
I.1.4.4 Devenir des chylomicrons dans la circulation sanguine.....	35
I.1.4.5 Les HDL intestinales	36
I.1.5 Etat de la question chez le chien.....	37
I.2 Le transport inverse du cholestérol.....	38
I.2.1 Métabolisme des HDL.....	38
I.2.1.1 Synthèse et sécrétion de l'apo A-I et des HDL naissantes	38
I.2.1.2 Conversion des pré β -HDL en α HDL.....	41

I.2.1.3 Remodelage des α HDL par les protéines de transfert et les lipases	42
Cholesteryl ester transfer protein (CETP).....	42
Phospholipid transfer protein (PLTP)	43
Lipoprotein lipase (LPL).....	43
Hepatic lipase (HL).....	44
Endothelial lipase (EL)	45
I.2.1.4 Catabolisme des HDL et capture sélective du HDL-cholestérol.....	46
I.2.2 Rôle des récepteurs nucléaires dans le transport inverse du cholestérol	48
PPARs	48
LXRs	49
FXR.....	49
I.2.3 Lipoprotéines et transport inverse du cholestérol chez le chien	50
Les lipoprotéines	51
Les apolipoprotéines	51
Les protéines de transfert et les lipases.....	52
Les récepteurs	53
Le transport inverse du cholestérol chez le chien	53
II . Effets de l'insulinorésistance sur l'absorption intestinale et le transport inverse du cholestérol	55
II.1 Généralités sur le syndrome d'insulinorésistance	55
II.1.1 Définition du syndrome d'insulinorésistance.....	55
II.1.2 Physiopathologie de l'insulinorésistance	57
II.1.2.1 Altération de la voie de signalisation de l'insuline	57
II.1.2.2 Obésité.....	58
II.1.2.3 Intolérance au glucose	59
II.1.2.4 Hypertension, dysfonction endothéliale et thrombogenèse.....	60
II.1.2.5 Dyslipidémie	61
II.2 Effets de l'insulinorésistance sur l'absorption intestinale du cholestérol	65
II.2.1 Insulinorésistance et absorption du cholestérol.....	65
II.2.2 Insulinorésistance et lipoprotéines intestinales	68
II.3 Effets de l'insulinorésistance sur le transport inverse du cholestérol	71
II.3.1 Insulinorésistance et formation des pré β -HDL	71
II.3.2 Insulinorésistance, enzymes de transfert et lipases	72
LCAT	73

PLTP	73
CETP.....	73
HL	74
LPL	75
EL.....	75
II.3.3 Insulinorésistance, récepteurs et capture sélective du HDL-cholestérol.....	76
II.4 Le chien modèle animal de l'insulinorésistance	77
III . Traitements pharmacologiques des dyslipidémies associées à l'insulinorésistance.....	78
III.1 Les traitements actuels.....	78
III.1.1 Les inhibiteurs de l'HMG-CoA reductase (statines)	78
III.1.2 Les agonistes PPAR α (fibrates)	80
III.1.3 Les agonistes PPAR γ (thiazolidinediones)	80
III.2 Les traitements émergents.....	81
III.2.1 Les inhibiteurs de CETP	81
III.2.2 Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol.....	82
III.2.3 Les doubles agonistes de PPAR α /PPAR γ	83
III.3 Conclusion : Intérêt du chien dans les études sur l'insulinorésistance et les traitements pharmacologiques	84
OBJECTIFS	85
PARTIE EXPERIMENTALE	87
IV . Mesure de l'absorption intestinale du cholestérol et exploration cinétique du métabolisme des HDL.....	88
IV.1 Méthodes de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol	88
IV.1.1 Mesure du transport lymphatique du cholestérol (mesure directe)	88
IV.1.2 Méthode fécale (Fecal dual-isotope ratio method)	90
IV.1.3 Méthode de la balance des stérols	90
IV.1.4 Méthode de Zilversmit (dual-isotope ratio method).....	91
IV.1.5 Utilisation des phytostérols comme marqueurs de l'absorption intestinale	91
IV.1.6 Mesure de l'absorption intestinale du cholestérol chez le chien	92
IV.2 Exploration cinétique du métabolisme des HDL.....	93
IV.2.1 Aspects méthodologiques	93
Méthodes de marquage	93
Administration du traceur	94
Analyse cinétique par modélisation:définitions.....	94

Equations différentielles	96
Fractional catabolic rate (FCR) et absolute production rate (APR).....	96
Analyse cinétique du métabolisme des lipoprotéines par le logiciel SAAMII.....	97
IV.2.2 Métabolisme de l'apolipoprotéine A-I.....	97
IV.2.3 Métabolisme du cholestérol.....	100
IV.2.4 Exploration cinétique du métabolisme des lipoprotéines chez le chien	102
TRAVAUX PERSONNELS.....	103
V . Etude de l'absorption intestinale du cholestérol et de la lipémie post-prandiale.....	104
V.1 Effets de l'atorvastatine sur l'absorption intestinale du cholestérol	104
V.1.1 Introduction.....	104
V.1.2 Article n°1	105
V.1.3 Discussion	124
V.2 Effets de l'insulinorésistance sur l'absorption intestinale du cholestérol et sa re- sécrétion dans les chylomicrons.....	126
V.2.1 Introduction.....	126
V.2.2 Article n°2	127
V.2.3 Discussion	153
V.3 Effets de la rosiglitazone sur la lipémie post-prandiale chez le chien obèse insulinorésistant	155
V.3.1 Introduction.....	155
V.3.2 Article n°3	156
V.3.3 Discussion	179
VI . Etude du transport inverse du cholestérol.....	180
VI.1 Effets de l'insulinorésistance sur le transport inverse du cholestérol.....	180
VI.1.1 Introduction.....	180
VI.1.2 Article n°4.....	181
VI.1.3 Discussion.....	193
VI.2 Effets de l'atorvastatine sur le métabolisme de l'apo A-I des HDL.....	195
VI.2.1 Introduction.....	195
VI.2.2 Article n°5.....	196
VI.2.3 Discussion.....	222
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	224
REFERENCES	229

ABREVIATIONS

ABCA1	Adenosine triphosphate-binding cassette protein A1
ABCG5	Adenosine triphosphate-binding cassette protein G5
ABCG8	Adenosine triphosphate-binding cassette protein G8
ACAT	Acyl-coA:cholesterol acyl transferase
Apo	Apolipoprotéine
APR	Absolute production rate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
BSEP	Bile salt excretion pump
CE	Cholesteryl esters
CEL	Carboxyl ester lipase
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CL	Cholesterol libre
CR	Chylomicron remnants
EGIR	European Group for the study of Insulin Resistance
EL	Endothelial lipase
FABP	Fatty acid binding protein
FC	Free cholesterol
FCR	Fractional catabolic rate
FED	Fish Eye Disease
FXR	farnesoid X receptor
GLUT-4	Glucose transporter 4
HOMA	Homeostatic model assessment
HDL	High density lipoprotein
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol
HL	Hepatic lipase
HMG-CoA	Hydroxymethyl glutaryl-coenzyme A
IDL	Intermediate density lipoprotein
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de masse corporelle
IRS	Insulin receptor substrate
LCAT	Lecithin: cholesterol acyl transferase

LDL	Low density lipoprotein
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
LDL-R	Low density lipoprotein receptor
LPL	Lipoprotein lipase
LRP	Low density lipoprotein receptor related protein
LXRs	Liver X receptors
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NCEP:ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NO	Monoxide d'azote
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like 1 protein
OLEFT	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PDI	Protein disulfide isomerase
PEPCK	Phosphoenol pyruvate carboxykinase
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PL	Phospholipides
PLTP	Phospholipid transfer protein
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
PTL	Pancreatic triglyceride lipase
PTLRP	Pancreatic lipase related protein
PTP-1B	Protein tyrosine phosphatase-1B
RE	Réticulum endoplasmique
REG	Réticulum endoplasmique granuleux
REL	Réticulum endoplasmique lisse
RXRs	Retinoïd X receptors
SREBP	Sterol response element binding protein
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
TIC	Transport inverse du cholestérol
TG	Triglycérides
TRL	Triglyceride rich lipoprotein
TNFα	Tumor necrosis factor α
VLDL	Very low density lipoprotein

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau 1	Expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines
Tableau 2	Principales enzymes de transfert et lipases impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme
Tableau 3	Expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines canines
Tableau 4	Comparaison des définitions du syndrome métabolique
Tableau 5	Comparaison de l'effet hypolipémiant et de la pharmacologie des six statines disponibles en 2003
Tableau 6	Pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol suivant les espèces et les méthodes de mesure

FIGURES

Figure 1	Absorption du cholestérol et formation des lipoprotéines dans l'entérocyte
Figure 2	Structure type d'un récepteur de la superfamille ABC
Figure 3	Représentation schématique de la structure du récepteur SR-BI
Figure 4	Cycle entéro-hépatique du cholestérol
Figure 5	Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires LXR et PPAR
Figure 6	Les différentes classes de lipoprotéines chez l'homme
Figure 7	Assemblage des chylomicrons dans l'entérocyte
Figure 8	Efflux du cholestérol cellulaire et formation des pré β -HDL
Figure 9	Origine des pré β -HDL et conversion en α HDL chez l'homme
Figure 10	Transport inverse du cholestérol chez l'homme

Figure 11	Capture hépatique du cholestérol
Figure 12	Les différentes classes de lipoprotéines chez le chien
Figure 13	Transport inverse du cholestérol chez le chien
Figure 14	Voie de signalisation de l'insuline
Figure 15	Stimulation des voies PI3-K et MAPK par l'insuline dans les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux sanguins
Figure 16	Effets de l'insulinorésistance sur le métabolisme des lipoprotéines
Figure 17	Mécanismes impliqués dans la surproduction hépatique des VLDL-apoB100
Figure 18	Effets de l'insulinorésistance sur l'absorption intestinale du cholestérol et le métabolisme des chylomicrons
Figure 19	Formation de la plaque athéromateuse
Figure 20	Effets de l'insulinorésistance sur le transport inverse du cholestérol chez l'homme
Figure 21	Mécanismes d'action des statines
Figure 22	Exemple de modèle
Figure 23	Modèle monocompartimental du métabolisme de l'apo A-I des HDL
Figure 24	Modèle multicompartimental du métabolisme de l'apo A-I des HDL
Figure 25	Modèle multicompartimental du métabolisme de l'apo A-I des HDL selon Fisher et al., 1995
Figure 26	Modèle multicompartimental du métabolisme de l'apo A-I des HDL Lp A-I et Lp A-I/A-II
Figure 27	Modèle complet du renouvellement du cholestérol selon Ouguerram et al. 2002

INTRODUCTION

Introduction

Les maladies chroniques non transmissibles telles que le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique, tant dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. Les profonds changements environnementaux et comportementaux qui accompagnent le phénomène de globalisation favorisent l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète de type II.

Associé à ces maladies, le syndrome d'insulinorésistance ou syndrome métabolique regroupe une myriade d'anomalies métaboliques : résistance à l'insuline, hyperglycémie, intolérance au glucose, dyslipidémie, hypertension et, en conséquence, risque cardiovasculaire. Bien que la prévention de ces facteurs de risque cardiovasculaire repose prioritairement sur l'alimentation, l'activité physique ou encore la perte de poids, le développement de traitements pharmacologiques du syndrome métabolique s'avère indispensable pour faire face à l'augmentation de la prévalence de ces maladies. La concentration plasmatique en cholestérol étant positivement corrélée au risque cardiovasculaire, les traitements actuels et futurs s'appuient en partie sur deux stratégies : (i) inhiber l'absorption intestinale du cholestérol pour en diminuer les taux plasmatiques, (ii) optimiser le transport inverse du cholestérol, processus qui permet le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie puis son élimination par la voie biliaire.

Dans cette démarche, les modèles animaux du syndrome métabolique (souris, rat, hamster...) représentent un outil essentiel. Des modèles canins d'obésité et d'insulinorésistance ont également été développés pour étudier l'hypertension, l'intolérance au glucose ou encore le rôle des acides gras libres dans l'insulinorésistance. Le chien présente en effet de nombreux avantages, notamment par sa taille, mais aussi par son adaptabilité aux protocoles expérimentaux. Ainsi, un grand nombre de nouvelles molécules destinées au traitement du syndrome métabolique sont testées sur le chien, sans qu'on connaisse précisément son métabolisme lipidique et glucidique. Nous avons précédemment utilisé ce modèle pour caractériser les conséquences de ce syndrome sur le métabolisme des lipoprotéines. Chez le chien, l'insulinorésistance provoque une dyslipidémie comparable à celle observée chez l'homme: hypertriglycéridémie, taux d'acides gras libres plasmatiques élevés, HDL-cholestérol diminué. Nous avons également rapporté que des bio-marqueurs de l'insulinorésistance, tels que le $\text{TNF}\alpha$ et l'IGF-1, sont augmentés, tandis que les récepteurs nucléaires $\text{PPAR}\alpha$ (foie) et $\text{PPAR}\gamma$ (tissu adipeux viscéral, muscle) voient leur expression diminuée. D'autre part, nous avons montré l'intérêt de notre modèle dans les études

Introduction

cinétiques du métabolisme des lipoprotéines, basés sur l'utilisation d'isotopes stables. Grâce à ces études, nous avons mis en évidence un transport inverse du cholestérol très actif chez le chien, avec une capture sélective SR-BI dépendante qui représente 60% du catabolisme des esters de cholestérol des HDL.

Considérant ces premières données, des études plus approfondies nous ont paru nécessaires pour utiliser le chien dans l'étude du syndrome d'insulinorésistance et le développement des traitements pharmacologiques des dyslipidémies. L'objectif de ce travail a donc été d'étudier ces deux processus du métabolisme des lipoprotéines qui représentent actuellement des cibles pharmacologiques majeures: d'une part l'absorption intestinale du cholestérol et sa re-sécrétion dans les chylomicrons, d'autre part le transport inverse du cholestérol.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ABSORPTION INTESTINALE ET TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL

I.1 Absorption intestinale du cholestérol

I.1.1 Métabolisme du cholestérol dans la lumière intestinale

Le cholestérol entrant dans la lumière intestinale peut provenir (i) des aliments, (ii) de la bile et (iii) de la dégénérescence de l'épithélium intestinal. Chaque jour, ces 3 sources représentent respectivement 300-500mg, 800-1200mg et 300mg de cholestérol chez l'homme. Bien que l'intestin ait la capacité d'absorber du cholestérol sur toute sa longueur, les sites principaux d'absorption sont le duodénum et le jéjunum proximal (pour revue, Lammert & al., 2005). Le pourcentage moyen d'absorption chez l'homme est de 50% (Wang et al., 2003), mais les variations inter-individuelles peuvent être importantes (Kern, 1991), variant de 30 à 80% (Bosner et al., 1999).

L'absorption des lipides alimentaires débute dans l'estomac où les triglycérides sont hydrolysés par les lipases linguale et gastrique (pour revue, Mu et al., 2004). Les produits de cette hydrolyse constituent alors le chyme gastrique, qui passe dans la lumière intestinale pour un mélange avec la bile et les sucs pancréatiques. De nombreuses enzymes hydrolysent les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol estérifié d'origine alimentaire. Ensuite, l'incorporation du cholestérol libre (dont la solubilité est faible) dans les micelles contenant les acides biliaires, les phospholipides, et les acides gras représentent une étape critique. En effet, la solubilisation micellaire du cholestérol est essentielle pour sa diffusion à travers la couche aqueuse qui recouvre la muqueuse intestinale (pour revue, Turley et al, 2003). Enfin, ces micelles se désagrègent au niveau de la membrane apicale permettant l'absorption du cholestérol par l'entérocyte.

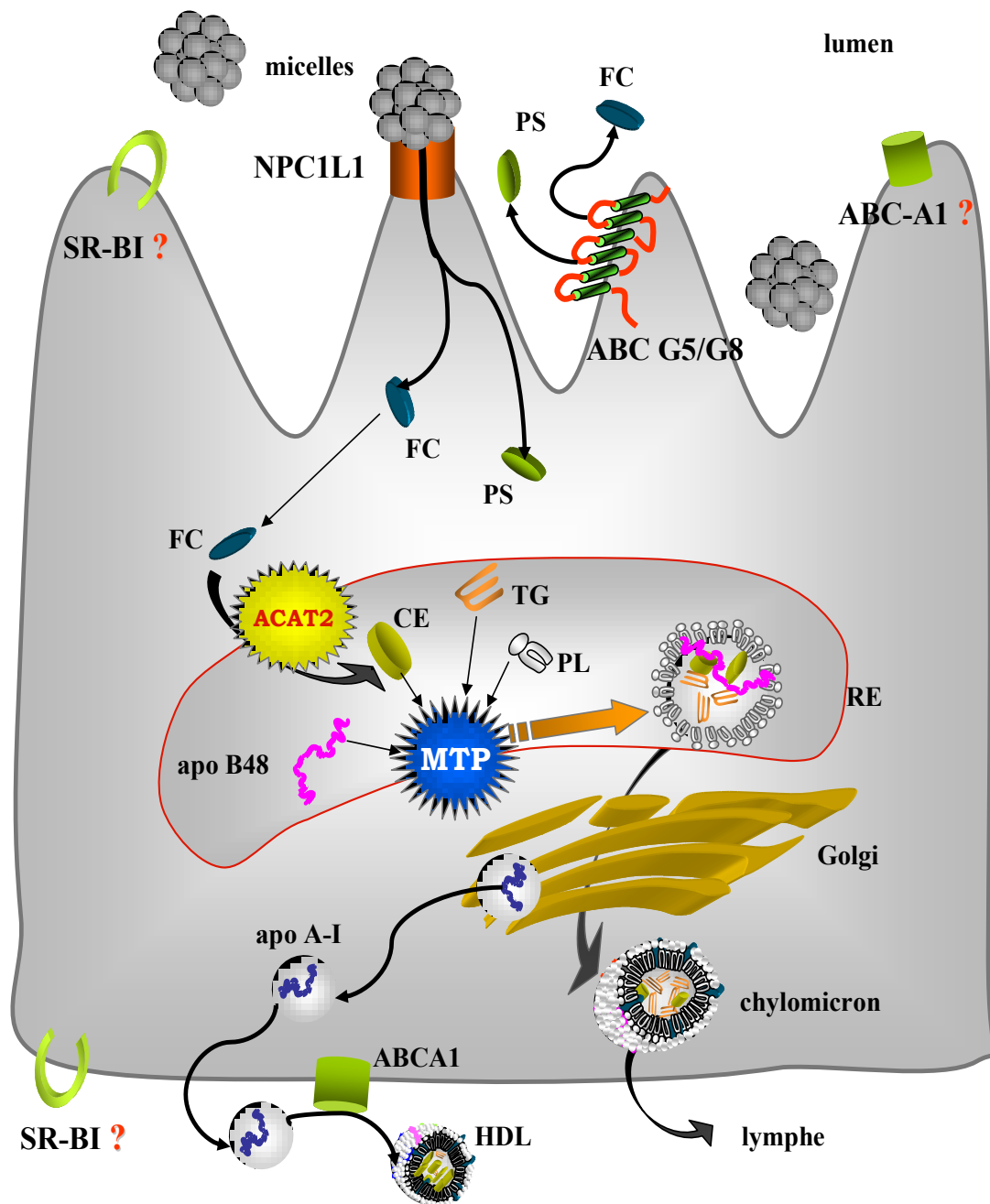


Figure 1. Absorption du cholestérol et formation des lipoprotéines dans l'entérocyte
 (ABCA1, adenosine triphosphate-binding cassette protein A1;
 ACAT2, acyl-CoA:cholesterol acyl transferase; apo, apolipoprotéine;
 MTP, microsomal triglyceride transfer protein; PS, phytostérols;
 SR-BI, scavenger receptor class B type I)

I.1.2 Les récepteurs impliqués dans l'absorption intestinale du cholestérol

Bien que la diffusion passive du cholestérol, suivant un gradient de concentration, ait été évoquée (Stange et al., 1985), son efflux rapide du pôle apical vers la membrane basolatérale de l'entérocyte, les variations interindividuelles et l'inhibition de l'absorption du cholestérol par des inhibiteurs spécifiques suggèrent que ce processus est régulé par de nombreux gènes et récepteurs (Lammert et al., 2005). Les récepteurs membranaires impliqués n'ont été découverts et étudiés que très récemment (figure 1). Ils représentent des cibles potentielles dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

I.1.2.1 Les récepteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC (adenosine triphosphate-binding cassette) regroupe une cinquantaine de protéines transmembranaires qui permettent, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, le transport d'une grande variété de substrats tels que les acides aminés, les lipides, liposaccharides, peptides, métaux, et drogues (Higgins, 1992). Comme l'indique la figure 2, chaque transporteur ABC comprend deux domaines transmembranaires et deux domaines NBD (nucleotide binding domain) liant l'ATP (pour revue, voir Stefkova et al., 2004).

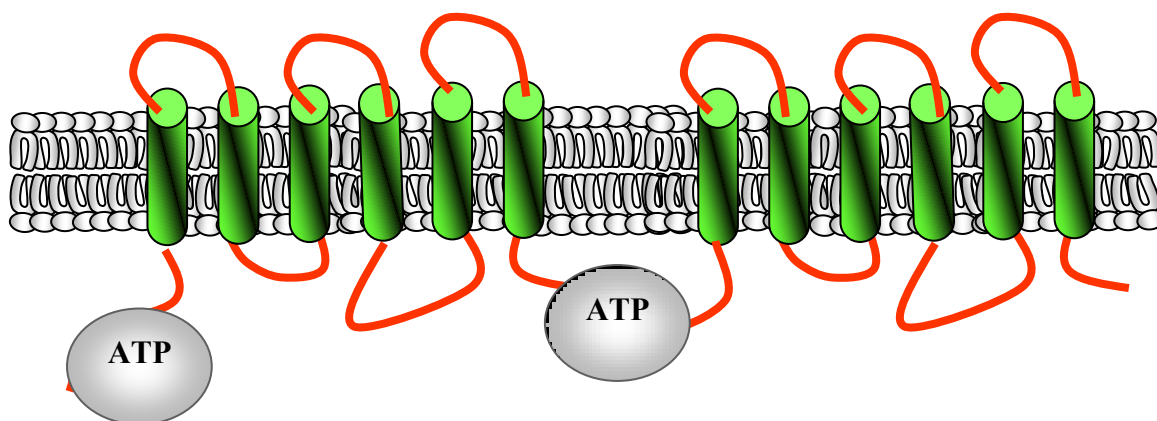


Figure 2. Structure type d'un récepteur de la superfamille ABC
(ATP, adenosine triphosphate)

ABCG5 & ABCG8

Le concept de transporteurs régulant le transport intestinal des stérols fut introduit grâce aux études sur les patients souffrant de sitostérolémie. Cette maladie génétique rare (1 cas pour 5000000) est caractérisée par des concentrations plasmatiques en stérols végétaux très importantes et un processus athérosclérotique accéléré, augmentant ainsi la fréquence des accidents cardio-vasculaires (Miettinen, 1980). L'augmentation des concentrations en stérols végétaux s'explique par une absorption intestinale du cholestérol augmentée et une excrétion biliaire des stérols diminuée. Les taux de cholestérol plasmatique peuvent atteindre 5g/L chez certains patients (Rader et al., 2003).

Les causes moléculaires de cette augmentation d'absorption du cholestérol ont été élucidées par Berge et al., en identifiant les deux semi-transporteurs ABCG5 & ABCG8 (adenosine triphosphate-binding cassette protein G5/G8), non fonctionnels chez les patients atteints de sitostérolémie (Berge et al., 2000). Ces deux semi-transporteurs sont exprimés sur la membrane apicale des entérocytes et des canalicules biliaires hépatiques. Dans l'intestin comme dans le foie, ABCG5/ABCG8 forment un hétérodimère qui facilite l'efflux des stérols libres (cholestérol et phytostérols) à l'extérieur de la cellule, soit dans la lumière intestinale, soit dans la bile (Yu et al., 2002). L'expression de ces récepteurs augmente avec un régime riche en cholestérol (Repa et al., 2002). La surexpression de ces deux récepteurs chez la souris induit une augmentation de la sécrétion du cholestérol dans la bile et une diminution de son absorption intestinale (Yu et al., 2002). Inversement, les souris déficientes en ABCG8 (ABCG8^{-/-}) ont des sécrétions biliaires de cholestérol réduites, alors que l'absorption intestinale du cholestérol et du sitostanol est augmentée (Klett et al., 2004). Enfin, il a été montré chez la souris que les récepteurs ABCG5/ABCG8 jouaient un rôle régulateur de l'absorption intestinale du cholestérol au niveau jéjunal et iléal (Duan et al., 2004).

ABCA1

La maladie de Tangier, caractérisée par une sévère déficience ou une absence de HDL (Hoffman et al., 1965), a pour origine une mutation du gène codant pour le récepteur ABCA1 (adenosine triphosphate-binding cassette protein A1) (Remaley et al., 1999). Bien qu'ABCA1 soit avant tout impliqué dans les premières étapes du transport inverse du cholestérol (Joyce et al., 2003), McNeish et al. ont été les premiers à proposer un rôle de ce récepteur dans l'absorption intestinale (McNeish et al., 2000).

Comparées à des souris sauvages, les souris ABCA1^{-/-} ont un pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol plus important ($81 \pm 9\%$ vs $69 \pm 6\%$, Mc Neish et al., 2000). Inversement, une diminution de 11% de l'absorption a été montrée chez les souris ABCA1^{-/-} comparées aux souris sauvages (Drobnik et al., 2001). Face à ces résultats contradictoires, un rôle d'ABCA1 dans l'efflux de cholestérol au niveau baso-latéral a également été évoqué. Chez le poulet WHAM (Wisconsin hypoalpha mutant), ABCA1 déficient, Mulligan et al. ont montré que l'absorption du cholestérol de la lumière intestinale vers l'entérocyte n'était pas altérée, ce qui indique qu'ABCA1 n'a pas de rôle dans l'absorption au niveau apical. Cependant, l'ingestion de cholestérol radioactif résulte en une accumulation de cholestérol estérifié dans l'intestin et le foie. ABCA1 aurait donc uniquement un rôle au niveau baso-latéral, en assurant l'efflux de cholestérol (Mulligan et al., 2003). Comme le montre la figure 1, l'apolipoprotéine A-I, sécrétée par l'entérocyte, agirait comme accepteur de cet efflux pour aboutir à la formation de HDL (Hussain et al., 2005). Chez la souris, la délétion spécifique d'ABCA1 dans l'intestin provoque une baisse de 30% du taux de HDL-cholestérol (Brunham et al., 2006).

I.1.2.2 SR-BI

Le récepteur SR-BI (scavenger receptor class B type I) a été premièrement identifié comme le récepteur assurant la captation sélective des esters de cholestérol des HDL (Acton et al., 1996). Membre de la superfamille des CD36, ce récepteur présente une boucle extracellulaire en fer à cheval avec de courts segment N- et C-terminaux cytoplasmiques (figure 3),

permettant la liaison aux VLDL, LDL intactes ou acétylées ou encore oxydées. Néanmoins, l'affinité de liaison pour les HDL reste la plus forte (Acton et al., 1996).

Majoritairement exprimé au niveau du foie et des tissus stéroïdogéniques, le SR-BI est également exprimé au niveau de la membrane apicale des entérocytes (Altmann et al., 2002). L'expression du récepteur est maximale au niveau de la partie proximale de l'intestin, pour décroître en allant vers la partie distale (Cai et al., 2001). Cette localisation a été le fruit de nombreuses investigations pour étudier le SR-BI comme un acteur potentiel de l'absorption intestinale du cholestérol. Chez le porc, il a en effet été montré une endocytose du SR-BI de la membrane apicale vers les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Hansen et al., 2003). Comparées à des contrôles, les souris SR-BI transgéniques ont également une absorption intestinale du cholestérol et des triglycérides significativement supérieure (Bietrix et al., 2006). Néanmoins, les études sur la souris SR-BI^{-/-} ont montré que l'absorption intestinale n'était pas affectée (Mardones et al., 2001 ; Altmann et al., 2002), ce qui indiquerait que le SR-BI n'est pas essentiel dans ce processus (van Bennekum et al., 2005). La fonction du SR-BI au niveau apical de l'entérocyte n'est donc pas encore élucidée. Un rôle essentiel dans l'absorption du beta-carotène a été mis en évidence chez la souris (van Bennekum et al., 2005). Cependant, le SR-BI est également présent au niveau baso-latéral de l'entérocyte (figure 1), ce qui suggère un rôle possible de liaison avec les lipoprotéines (Cai et al., 2001) qui reste à démontrer. Finalement, le SR-BI influencerait indirectement l'absorption intestinale du cholestérol via son expression hépatique. En effet, sa surexpression hépatique chez la souris induit une stimulation de l'excrétion du cholestérol dans la bile ce qui réduit significativement son absorption intestinale (Sehayek et al., 1998).

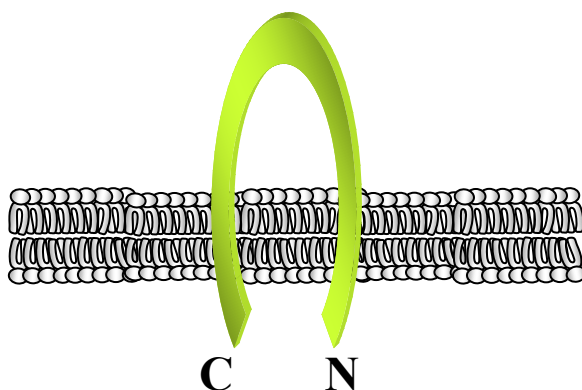


Figure 3. Représentation schématique de la structure du récepteur SR-BI

I.1.2.3 NPC1L1

Découverte par Altmann et Davis, la protéine Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) a été identifiée en 2004 comme "le" transporteur intestinal du cholestérol (Altmann et al., 2004). A partir d'analyses génomiques de transcrits de jejunum de rat, contenant les caractéristiques attendues d'un transporteur de cholestérol et conservées chez la souris et chez l'homme, un seul gène candidat a été identifié : NPC1L1. Celui-ci partage 50% d'homologie avec le gène Niemann-Pick C1, défectueux dans la maladie de Niemann-Pick, caractérisée par une accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Ioannou, 2001).

Chez l'homme, le NPC1L1 est majoritairement exprimée au niveau intestinal et hépatique, dans une moindre mesure au niveau de l'estomac, du cœur, des poumons et des ovaires. Dans l'intestin de rat, l'expression est maximale au niveau du jejunum. Plus précisément, l'expression de la protéine est confinée à la membrane apicale de l'entérocyte (Altmann et al., 2004). Les souris NPC1L1^{-/-} présentent un pourcentage d'absorption du cholestérol fortement diminué, comparé à celui des souris hétérozygotes et sauvages ($15.6 \pm 0.4\%$, $45.4 \pm 4\%$ et $51 \pm 3\%$, respectivement). Cependant, les souris NPC1L1^{-/-} présentent des taux de lipides plasmatiques similaires aux souris sauvages, du fait d'une augmentation d'activité de l'enzyme HMG-CoA reductase, enzyme impliquée dans la synthèse de cholestérol, dans le foie et l'intestin, sans modifier l'expression d'ABCG5/ABCG8. De plus, chez ces mêmes souris déficientes, les concentrations plasmatiques de stérols végétaux (sitostérol et campésterol) sont réduites de 90% comparés aux sauvages. En effet, l'absorption intestinale de ³H-sitostérol est réduite de 64% chez les souris NPC1L1^{-/-}, ce qui correspondrait aux effets d'une dose de 10mg d'ezetimibe, inhibiteur de l'absorption du cholestérol. L'ezetimibe n'a par ailleurs aucun effet sur l'absorption intestinale du cholestérol des souris NPC1L1^{-/-}, suggérant que NPC1L1 est la cible moléculaire de cet agent thérapeutique (Altmann et al., 2004 ; Davis et al., 2004). Cette interaction spécifique a été confirmée *in vitro* et *in vivo* (Garcia-Calvo M et al., 2005).

I.1.3 Régulation de l'absorption intestinale du cholestérol

I.1.3.1 Rôle des enzymes pancréatiques

Lors de son entrée dans la lumière intestinale, le cholestérol alimentaire est associé aux phospholipides et aux triglycérides sous forme d'émulsions lipidiques, stabilisées par les sels biliaires, et co-existe avec le cholestérol hépatique sécrété dans la bile. Des études *in vitro* ont montré que le cholestérol présent dans ces émulsions ne peut pas être directement absorbé par l'entérocyte (Young et al., 1999). Sans hydrolyse des émulsions, la taille de ces dernières est en effet trop importante pour traverser la couche aqueuse qui sépare les entérocytes de la lumière intestinale (pour revue, Hui et al., 2005). La nécessaire digestion des phospholipides, des triglycérides et des esters de cholestérol est assurée par des lipases sécrétées par le pancréas en phase post-prandiale telles que la pancreatic triglyceride lipase (PTL), les pancreatic lipase related protein 1 et 2 (PTLRP-1 et -2), la cholestérol estérase ainsi que la carboxyl ester lipase (CEL).

L'enzyme agissant prioritairement sur les émulsions lipidiques est la PTL (figure 4). Activée par la co-lipase, elle hydrolyse les triglycérides. Chez les souris PTL^{-/-}, la réduction de l'hydrolyse des triglycérides conduit à une diminution de l'absorption du cholestérol. L'association du cholestérol aux émulsions lipidiques est en fait prolongée. Les triglycérides ne sont finalement digérés qu'au niveau distal de l'intestin, dans la partie où l'absorption du cholestérol est la moins efficace (Huggins et al., 2003). Néanmoins, les souris PTL^{-/-} absorbent les triglycérides en quantité équivalente à celle des souris sauvages, ce qui signifie que la digestion des triglycérides peut être compensée par d'autres enzymes. La protéine PTLRP-1 n'ayant pas d'activité d'hydrolyse des triglycérides (Lowe, 2002), la protéine PTLRP-2, exprimée chez les nouveaux-nés avant la PTL et présente en faible quantité chez l'adulte, pourrait être une enzyme candidate. La carboxyl ester lipase (CEL), qui agit sur une gamme plus large de substrat (triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides) a été également évoquée comme jouant un rôle important dans l'hydrolyse des émulsions lipidiques. De plus, des études *in vitro* ont suggéré un phénomène d'endocytose de la CEL dans l'entérocyte, donnant un rôle potentiel de cette enzyme dans la régulation de l'absorption du cholestérol (Huang et al., 1990).

I.1.3.2 Rôle des sels biliaires

L'importance des sels biliaires dans le processus d'absorption intestinale est mise en évidence chez les patients atteints de cirrhose. Chez ces patients, le pool d'acides biliaires réduit par le dysfonctionnement hépatique provoque une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol (Ponz de Leon et al., 1981). Le rôle primordial des acides biliaires est également mis en évidence par les traitements à base de cholestyramine. En effet, grâce à ses propriétés de séquestration des acides biliaires, ce produit réduit significativement l'absorption intestinale du cholestérol (Mittendorfer et al., 2001).

La concentration en acides biliaires dans l'intestin peut être régulée par l'ASBT pour apical sodium-dependent bile acid transporter (également nommé IBAT). Ce transporteur participe à la circulation entéro-hépatique (figure 4), c'est-à-dire au re-captage des acides biliaires de l'intestin vers le foie (Hui et al., 2005). Néanmoins, l'activité de ce transporteur n'a pas d'effet direct sur l'absorption du cholestérol. En effet, l'inhibition pharmacologique d'ASBT provoque une baisse du taux de cholestérol plasmatique du fait d'une augmentation de la synthèse d'acides biliaires pour compenser une faible réabsorption intestinale (Galman et al., 2003). Finalement, l'inhibition de l'ASBT a permis de mettre en évidence un gradient de concentration d'acides biliaires (figure 4), qui décroît en allant vers la partie distale de l'intestin (Root et al., 2002). Cette différence de concentration expliquerait ainsi le gradient d'absorption du cholestérol observé le long de l'axe gastrocolique.

I.1.3.3 Rôle des récepteurs nucléaires

Le rôle des transporteurs ABC dans l'absorption intestinale du cholestérol a été suggéré par des études sur les agonistes des récepteurs nucléaires RXR (retinoid X receptors) et LXRs (Liver X receptors) connus pour réguler l'expression des récepteurs ABCA1 et ABCG5/G8 (Repa et al., 2000 ; Repa et al., 2002). La sous-famille des LXRs comprend deux membres, le LXR α et le LXR β (Peet et al., 1998). Les récepteurs LXRs régulent de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire du cholestérol en formant des hétérodimères avec le RXR (figure 5).

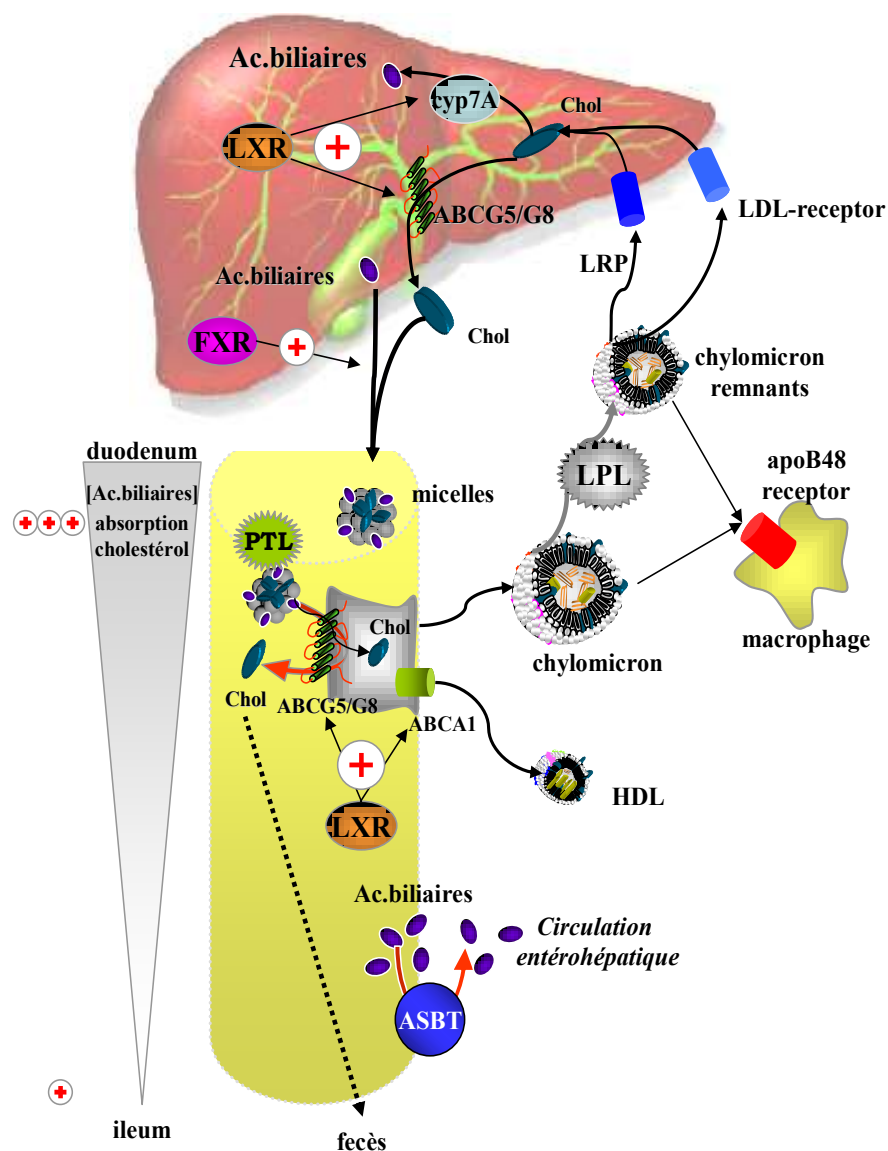


Figure 4. Cycle entéro-hépatique du cholestérol

Les récepteurs LXR sont activés par le cholestérol et les oxystérols endogènes tels que le 22(R)-hydroxycholestérol, le 24(S),25-époxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol (Sudhop et al., 2005). Il a été montré une augmentation de l'expression des récepteurs ABCG5/G8 avec le taux de cholestérol alimentaire (Repa et al., 2002). Plus récemment, il a été démontré que les activateurs des LXR diminuaient l'expression de l'ARNm de NPC1L1 dans les cellules Caco-2 (Duval et al., 2006). Les récepteurs LXR représentent donc une cible pharmacologique pour diminuer l'absorption intestinale (figure 4). Cependant, leur

activation conduit également à la stimulation de la lipogenèse hépatique, favorisant l'hypertriglycéridémie (Repa et al., 2002). Néanmoins, l'agoniste YT-32 ((22E)-ergost-22-ene-1 α ,3 β -diol)) diminue l'absorption intestinale du cholestérol chez la souris sans induire d'hypertriglycéridémie (Kaneko et al., 2003).

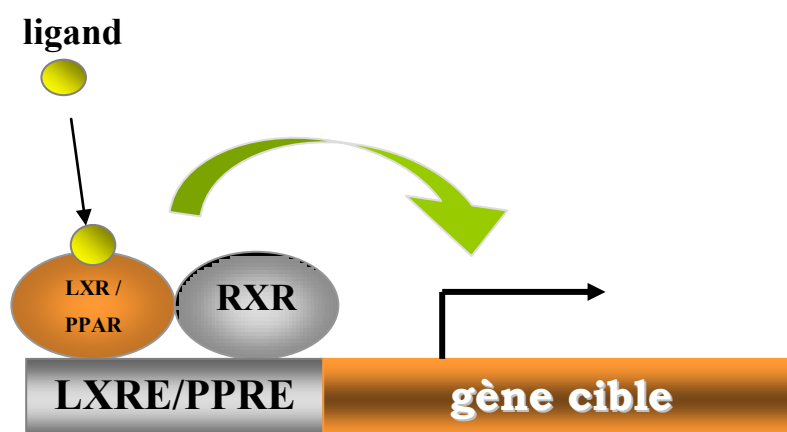


Figure 5. Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires LXR et PPAR

D'autre part, le LXR α induit la transcription de la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), une enzyme régulant la synthèse des acides biliaires (Peet et al., 1998). L'activation du LXR α au niveau hépatique induit également l'expression d'ABCG5/G8 (figure 4), favorisant ainsi l'excrétion biliaire du cholestérol (Repa et al., 2002). De même, le récepteur FXR (farnésoid X receptor) stimule le transport des acides biliaires dans la bile (Lambert et al., 2003), via l'activation de la protéine BSEP (bile salt excretion pump) (Ananthanarayanan et al., 2001). Ainsi, au niveau hépatique, les récepteurs nucléaires influenceraient indirectement l'absorption du cholestérol par leurs effets sur le métabolisme des acides biliaires et l'excrétion biliaire du cholestérol.

I.1.4 Les lipoprotéines intestinales

La formation des lipoprotéines intestinales est indispensable pour la re-sécrétion du cholestérol dans la circulation. Bien que les mécanismes impliqués dans la production des lipoprotéines intestinales ne soient pas élucidés, on distingue actuellement deux voies de

transport du cholestérol : (i) la voie apo B-dépendante qui correspond à la production des chylomicrons, (ii) la voie apo B-indépendante qui correspond à la production des HDL intestinales.

I.1.4.1 Les chylomicrons

Mécanismes d'assemblage des chylomicrons

D'origine intestinale, les chylomicrons sont des lipoprotéines, particules lipido-protéiques constituées par des triglycérides et des esters de cholestérol en leur centre et d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines dites apolipoprotéines. Uniquement sécrétés en période postprandiale, les chylomicrons ont la densité la plus faible et la taille la plus importante parmi toutes les classes de lipoprotéines (figure 6). Du fait de leur teneur en triglycérides, on les classe avec les VLDL dans les lipoprotéines riches en triglycérides ou TRL (pour triglyceride rich lipoprotein).

	chylomicron	VLDL	IDL	LDL	HDL ₂	HDL ₃
						
diamètre (Å)	800-5000	300-400	250-350	200-250	95-120	55-95
densité (g/mL)	<0.93	0.93-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.125	1.125-1.210
protéine*	2	10	17	23	42	56
apolipoprotéines majeures	B48, A, C, E	B100, A, C, E	B100, E	B100	A-I	A-I, A-II
TG*	90	54	20	4	5	3
CE*	2	13	34	41	13	15
CL*	1	7	9	11	5	3
PL*	5	16	20	21	35	23

Figure 6. Les différentes classes de lipoprotéines chez l'homme (Gotto, 1986)

(* % masse; CE, cholesteryl esters; CL, cholestérol; PL, phospholipides; TG, triglycérides)

apolipoprotéine	tissu	distribution	fonction
A-I	Foie, intestin	Chylomicron, HDL	Structurelle, activateur de la LCAT, efflux de cholestérol
A-II	Foie	HDL	Structurelle, activateur/inhibiteur de la HL, efflux de cholestérol
A-IV	Foie, intestin	Chylomicron, HDL	Transport inverse du cholestérol, activateur de la LCAT, métabolisme des TRL
A-V	Foie		Métabolisme des TRL
B100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle, synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du LDL-receptor
B48	Intestin	Chylomicron	Structurelle, synthèse et sécrétion des chylomicrons, ligand de l'apoB48-receptor
C-I	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibiteur de la CETP, activateur de la LCAT, inhibiteur de la liaison aux LDL-receptor et LRP
C-II	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Activateur de la LPL
C-III	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibiteur de la LPL, inhibiteur de la captation hépatique des TRL
D (A-III)	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	VLDL, LDL, HDL	?
E	Foie, macrophages, cerveau	Chylomicron, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDL-receptor et LRP
F	foie	LDL	Inhibiteur de la CETP
G		HDL	
H		HDL	
J		HDL	Anti-inflammatoire
L		HDL	
SAA		Chylomicron, HDL	Phase aiguë de l'inflammation

Tableau 1. Expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.

Les apolipoprotéines majeures associées aux chylomicrons sont : l'apolipoprotéine (apo) B48, l'apo A-I, l'apo A-IV, l'apo E et les apo C (I, II, III) (Hussain, 2000) dont les fonctions sont présentées dans le tableau 1.

La synthèse des chylomicrons se déroulent dans l'entérocyte et nécessite l'expression de l'apo B48. Celle-ci est traduite à partir de l'ARNm de l'apo B100, avec un phénomène d'editing post-transcriptionnel, catalysé par la protéine apobec-1 (figure 7) et qui provoque l'arrêt de la traduction : par la substitution d'une cytosine en uracile, le codon 2153 (CAA) devient alors un codon stop (UAA). L'apo B48 représente ainsi 48% de la séquence de l'apo B100 (Chan et al., 1997). Comme toute protéine sécrétée, sa synthèse s'effectue dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) (Gordon et al., 2000). Lors de sa traduction, l'apo B serait intégrée dans la membrane du réticulum endoplasmique avec une orientation transmembranaire telle qu'elle est accessible aux protéases, tant du côté luminal que du côté cytoplasmique (Davis et al., 1990). Cette exposition aux protéases serait limitée grâce à l'association de phospholipides avec l'apo B au cours de sa synthèse (Boren et al., 1992). En l'absence de cette association, l'apo B serait ubiquitinylée puis dégradée dans le protéasome (Benoist et al., 1997).

Il est important de noter que ces mécanismes sont le fruit d'extrapolations faites à partir d'études sur l'hépatocyte (Hussain, 2000). En effet, les données concernant l'entérocyte, basées sur des études *in vitro*, sont contradictoires. Une étude sur les cellules Caco-2, modèle *in vitro* de l'entérocyte, a montré une absence d'ubiquitinylation de l'apo B, ce qui protégerait la protéine de toute dégradation (Liao et al., 2000). Inversement, la dégradation de l'apoB48 a été observée sur des cultures primaires d'entérocytes de hamster (Haidari et al., 2002). L'existence de ces phénomènes et de leurs bases moléculaires demande donc à être d'avantage étudiée *in vitro* et *in vivo*.

D'autres études apportent cependant quelques données sur les mécanismes de formation des chylomicrons. L'assemblage des lipoprotéines à apoB48 s'effectuerait en deux étapes (figure 7). La première étape correspond à la formation de "lipoprotéines primordiales". L'apo B48, synthétisée dans le REG, migre en tant que composé membranaire vers le réticulum endoplasmique lisse (REL) pour s'associer aux phospholipides. Ces particules, de densité similaire au HDL, s'accumulent ensuite dans la lumière du REL (Cartwright et al., 2001 ; Guo et al., 2005). Deuxièmement, un chargement en lipides (triglycérides, phospholipides, cholestérol) lors de la phase postprandiale augmente la taille des particules

(phénomène de "core expansion" (Hussain, 2000)) jusqu'à former des chylomicrons (Cartwright et al., 2001).

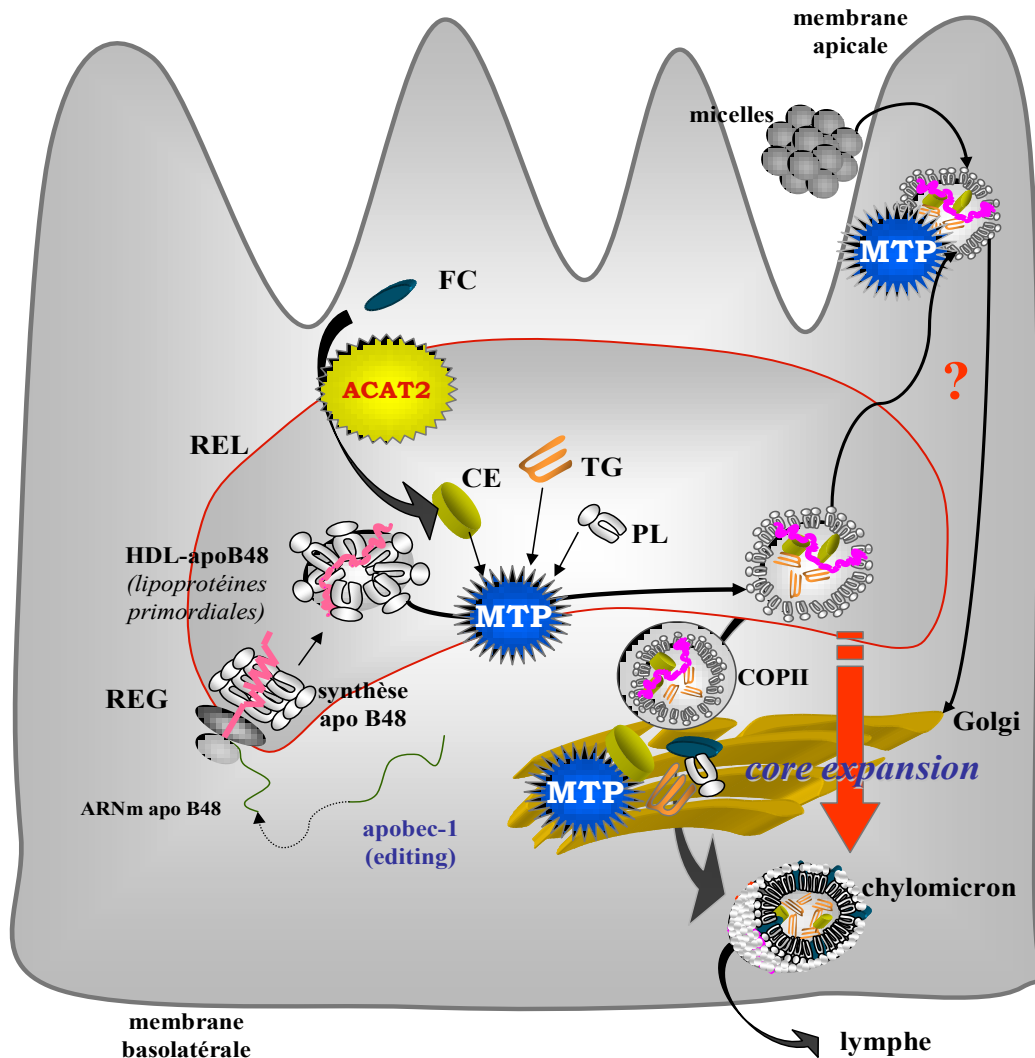


Figure 7. Assemblage des chylomicrons dans l'entérocyte
 (ACAT2, acyl-CoA:cholesterol acyl transferase; apo, apolipoprotéine;
 MTP, microsomal triglyceride transfer protein; REG, réticulum endoplasmique
 granuleux;REL, réticulum endoplasmique lisse)

Durant cette deuxième étape (figure 7), les particules migrent vers l'appareil de Golgi, sous forme de vésicules de transport de type COPII (Kumar et al., 1999), pour s'y enrichir en triglycérides et cholestérol. Les chylomicrons sont ensuite directement sécrétés dans la lymphe.

Néanmoins, une étude sur des cellules Caco-2 polarisées, suggère des trafics intracellulaires beaucoup plus complexes. Outre leur rôle potentiel de protection de l'apo B, les lipides favoriseraient une exportation microtubule-dépendante de l'apo B du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi vers la membrane apicale de l'entérocyte (figure 7). L'apport de cholestérol et d'acides gras libres au pôle apical entraînerait alors une migration des particules lipidiques contenant l'apo B vers la membrane baso-latérale (Morel et al., 2004). Ces mécanismes impliquent la nécessaire existence d'un pool stationnaire d'apo B, uniquement observé *in vitro* sur ce même modèle cellulaire (Liao et al., 2000). Par ailleurs, la sécrétion d'apo B48 ne nécessiterait pas forcément un apport de lipides, puisque l'entérocyte serait capable de synthétiser et de sécréter des lipoprotéines à apo B48 de type VLDL, LDL et HDL à jeun (Guo et al., 2005). Cependant, les observations de Morel et al. sont concordantes avec l'identification de la microsomal triglyceride transfer protein (MTP), protéine indispensable à la formation des chylomicrons (voir ci-dessous), dans la membrane des bordures en brosse de l'intestin (Slight et al., 2004).

Rôle de la MTP dans l'assemblage des chylomicrons

La microsomal triglyceride transfer protein (MTP) a été mise en évidence en 1985 (Wetterau et al., 1985). En catalysant le transfert des triglycérides, des phospholipides et des esters de cholestérol, cette protéine est indispensable à l'assemblage et la sécrétion des TRL, dans le foie et l'intestin (Lin et al., 1994). La MTP est un hétérodimère constitué de deux sous-unités de 58kD et de 88 kD. La plus petite correspond à la protein disulfide isomerase (PDI) qui maintient l'hétérodimère dans un état soluble (Slight et al., 2004), la plus large confère les propriétés catalytiques du complexe protéique (Lin et al., 1994). D'autre part, une étude sur le promoteur de la MTP a montré la présence d'un élément de réponse positive au cholestérol et d'un élément de réponse négative à l'insuline (Hagan et al., 1994). La mutation du gène codant pour la MTP provoque une abetalipoprotéïnémie (défaut de sécrétion des lipoprotéines à apo B), qui se manifeste par une malabsorption des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles (Wetterau et al., 1992). Etant donné le rôle crucial de la MTP dans la sécrétion des TRL, son inhibition représente une cible thérapeutique potentielle, mais elle provoque une accumulation hépatique de triglycérides qui représente un problème majeur (Chandler et al., 2003). Néanmoins, inhiber la MTP uniquement au niveau intestinal serait une alternative intéressante pour éviter cet effet néfaste. Cette stratégie a d'ailleurs été

récemment testée chez le porc avec des effets hypolipémiants encourageants (Aggarwal et al., 2005).

Dans l'intestin de souris et de hamster, l'expression de la MTP est maximale dans la partie proximale, pour décroître en allant vers la partie distale (Swift et al., 2005; Lin et al., 1994). Chez le hamster, l'expression et l'activité de la MTP est significativement augmentée dans l'intestin et le foie lors d'un régime riche en lipides (Lin et al., 1994). Au niveau intracellulaire, la localisation de la MTP au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Hussain, 2000), mais également dans l'appareil de Golgi (Levy et al., 2002), met en évidence son rôle dans les différentes étapes de l'assemblage des chylomicrons (voir figure 7). Dans le RE, la MTP transfère les lipides neutres vers l'apo B associée aux phospholipides dans la membrane du RE, formant ainsi les "lipoprotéines primordiales" (Hussain, 2000). La MTP possédant une forte affinité de liaison à l'apo B, elle permettrait, en plus de son rôle de protection de l'apo B face à la dégradation (Bakillah et al., 2000), la séparation des lipoprotéines primordiales de la membrane du RE (Wu et al., 1996). Enfin, en catalysant le transfert des lipides sur ces particules, la MTP favorise l'augmentation de la taille des particules pour aboutir à la formation des chylomicrons (Hussain, 2000).

Concernant l'entérocyte, il faut néanmoins noter que d'autres mécanismes impliquant la MTP sont possibles. Comme évoqué plus haut, la MTP a également été localisée au niveau apical, dans la membrane des bordures en brosse (Slight et al., 2004), ce qui suggère d'autres processus pour l'instant inconnus. De plus, bien que la régulation de l'expression hépatique de la MTP soit partiellement connue, les mécanismes moléculaires agissant sur son expression intestinale peuvent largement différer et sont à ce jour peu détaillés. Par exemple, l'activation du récepteur nucléaire PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) augmente l'expression et l'activité de la MTP au niveau hépatique mais pas au niveau intestinal (Ameen et al., 2005).

Rôle de l'ACAT2

L'acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) permet la production intracellulaire d'esters de cholestérol. Deux gènes de l'ACAT ont été identifiés chez les primates, l'ACAT1 exprimée dans le foie et les macrophages, l'ACAT2 exprimée dans le foie et l'intestin (Anderson et al., 1998). En fournissant les esters de cholestérol, ces deux enzymes participent à l'assemblage des lipoprotéines dans le foie pour l'ACAT1, dans l'intestin pour l'ACAT2 (pour revue, Chang et al., 2001). A l'heure actuelle, les données concernant l'ACAT2 sont peu développées. Comme l'indique la figure 7, elle a été clairement localisée dans le réticulum endoplasmique (Lee et al., 2000; Lin et al., 2003), mais les mécanismes régulant son expression ne sont pas connus. Néanmoins, l'ACAT2 jouerait un rôle important dans le processus d'absorption intestinale du cholestérol. Localisée dans la partie apicale des villosités intestinales, l'ACAT2 modulerait sensiblement les taux plasmatiques de cholestérol (Lee et al., 2000). Comparées à des souris contrôles, les souris déficientes en ACAT2, nourries avec un régime riche en cholestérol, montrent une importante réduction de l'absorption intestinale et des taux plasmatiques de cholestérol (Buhman et al., 2000). De plus, chez la souris, il a été mis en évidence une accumulation d'esters de cholestérol produits par l'ACAT2 dans les plaques d'athérome et le plasma (Lee et al., 2004). L'ACAT2 représenterait donc une cible thérapeutique potentielle dans la prévention des maladies cardiovasculaires (pour revue, Rudell et al., 2005).

I.1.4.2 Régulation de la sécrétion des chylomicrons

A ce jour, les mécanismes régulant la sécrétion des chylomicrons sont peu connus. Cependant, la régulation de la transcription de l'apoB pourrait agir sur la production des lipoprotéines intestinales. Sur des cellules Caco-2, Singh et al. ont montré une augmentation de la sécrétion des lipoprotéines à apoB en présence de transforming growth factor beta (TGF- β). Le TGF- β active le facteur de transcription SMAD qui se fixe sur le promoteur du gène de l'apo B (Singh et al., 2002). De même, la surexpression de l'apo A-IV augmente significativement la sécrétion des chylomicrons par des entérocytes porcins mis en culture. L'expression de l'apo A-IV est elle-même stimulée lorsque le milieu de culture est enrichi en lipides (Lu et al., 2005). En outre, l'augmentation de la lipogenèse dans l'entérocyte,

observée chez le hamster nourris avec un régime riche en fructose, provoque également une hypersécrétion des lipoprotéines à apoB48, avec une augmentation de l'expression et de l'activité de la MTP (Haidari et al., 2002).

I.1.4.3 Mécanismes de sécrétion du cholestérol des chylomicrons

Les mécanismes de sécrétion du cholestérol des chylomicrons en phase postprandiale chez l'homme ont été peu décrits. Néanmoins, par marquage isotopique du cholestérol, Beaumier-Gallon et al. ont pu montrer que le cholestérol ingéré lors d'un premier repas est re-sécrété dans les chylomicrons au cours des 3 phases postprandiales de la journée (Beaumier-Gallon et al., 2001). Ces observations ont permis d'établir un "modèle de vagues" : le cholestérol issu d'une première prise alimentaire est re-sécrété de façon limitée (1/3 du cholestérol total) au sein des chylomicrons dans une première vague de lipides. Lors de la deuxième prise alimentaire, la moitié du cholestérol issu du premier repas est re-sécrété dans les chylomicrons (seconde vague). Enfin, lors d'une troisième phase postprandiale (troisième vague), l'entérocyte re-sécrète dans les chylomicrons le reste du cholestérol issu du premier repas (Beaumier-Gallon et al., 2001). Les mécanismes intracellulaires formant ces vagues ne sont pas connus.

I.1.4.4 Devenir des chylomicrons dans la circulation sanguine

Lors de leur entrée dans la circulation sanguine (figure 4), les chylomicrons subissent l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), majoritairement exprimée au niveau du tissu adipeux et musculaire (pour revue sur la LPL, Preiss-Landl et al., 2002). La LPL hydrolyse les triglycérides des chylomicrons pour produire acides gras libres et glycérol. Lors de ce processus, les apolipoprotéines et les phospholipides des chylomicrons sont libérés dans la circulation et re-captés par d'autres lipoprotéines, majoritairement les HDL (Tall et al., 1979). Ce mécanisme aboutit finalement à la formation d'une lipoprotéine résiduelle riche en esters de cholestérol appelée chylomicron remnant. Les chylomicrons remnants sont rapidement captés par le foie (figure 4), grâce à la présence des récepteurs LDL (Low Density

Lipoprotein-receptor) et LRP (Low Density Lipoprotein receptor related protein), via un mécanisme d'endocytose (Martins et al., 2004), après reconnaissance de leur apo E.

Au niveau périphérique, les macrophages captent également les chylomicrons remnants grâce à un récepteur spécifique pour l'apoB48 (figure 4), l'apoB48-receptor (Brown et al., 2000). Du fait de la présence de ce récepteur, les chylomicrons remnants ont un pouvoir athérogène, puisque la mise en culture de macrophages en présence de chylomicrons remnants provoque une accumulation intracellulaire en lipides, transformant les macrophages en cellules spumeuses (Brown et al., 2000).

I.1.4.5 Les HDL intestinales

Il a été récemment montré que l'absorption intestinale du cholestérol pouvait suivre deux voies, l'une apo B-dépendante correspondant à l'assemblage des chylomicrons, l'autre apo B-indépendante. La voie apo B-indépendante correspond à la formation de HDL au niveau baso-latéral de l'entérocyte (figure 1), grâce à un mécanisme d'efflux lipidique impliquant l'apo A-I et le récepteur ABCA1 (Iqbal et al., 2005). Ce mécanisme, qui représenterait 25-30% de l'absorption totale du cholestérol chez la souris (Iqbal et al., 2005) a été conforté par des études *in vivo*. En effet, la délétion spécifique d'ABCA1 au niveau intestinal provoque une baisse du HDL-cholestérol de 30% chez la souris (Brunham et al., 2006). En outre, les HDL formées dans l'intestin grâce au récepteur ABCA1 seraient directement sécrétées dans la circulation sanguine (Brunham et al., 2006).

Bien que la voie apo B-dépendante ne soit pas affectée chez les souris apo A-I^{-/-}, la re-sécrétion du cholestérol alimentaire via les HDL est altérée, ce qui diminue significativement l'absorption intestinale du cholestérol à court terme (Iqbal et al., 2005). En effet, grâce à une compensation apo B-dépendante, l'absorption intestinale à plus long terme ne diffère pas de celle des souris sauvages. Néanmoins, l'existence de la voie apo B-indépendante a également été supportée par les études sur les souris déficientes en ACAT2. Les souris ACAT2^{-/-} suivant un régime standard ont un taux d'absorption intestinale du cholestérol similaire à des souris sauvages. En revanche, lorsque le régime est enrichi en cholestérol, ce taux d'absorption diminue de 85% comparé aux souris sauvages (Lee et al., 2004). Enfin, l'absence d'expression de l'ACAT2 provoque une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant pour ABCA1 (Repa et al., 2004), confirmant ainsi le rôle d'ABCA1 dans la

voie apo B-indépendante. D'un point de vue thérapeutique, la découverte de ces mécanismes est importante, étant donné que l'inhibition de la voie apo B-dépendante n'a pas été pour l'instant concluante (Hussain et al., 2005).

I.1.5 Etat de la question chez le chien

Les données concernant l'absorption intestinale du cholestérol chez le chien sont peu développées. A partir des années 1990, les investigateurs du métabolisme lipidique ont délaissé le modèle canin pour des modèles de plus petite taille. Même si la localisation intestinale de la MTP a été récemment étudiée chez le chien (Slight et al., 2004), les récepteurs tant membranaires que nucléaires impliqués dans les mécanismes d'absorption intestinale n'ont à ce jour pas encore été décrits.

Quelques études sur le chien ont été menées durant les années 1970-80. Il a en effet été établi un pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol compris entre 70 et 90% chez le chien (Melchior et al., 1985). Pertsemlidis et al. ont également rapporté des valeurs comparables (Pertsemlidis et al., 1973). Ce pourcentage est significativement diminué (20-30%) avec un régime hypercholestérolémique (Melchior et al., 1985). Des études sur le métabolisme des chylomicrons et sur leurs récepteurs hépatiques ont été également menées, mettant en évidence un catabolisme élevé des chylomicrons remnants (Melchior et al., 1981) et une baisse de l'expression du LDL-receptor chez le chien hypercholestérolémique (Fainaru et al., 1988). La composition lipidique des chylomicrons a également été étudiée par Zilversmit (Zilversmit, 1965).

En bref, malgré le rôle important joué par le chien dans le développement de molécules hypolipémiantes comme l'ezetimibe (Davis et al., 2001), il est forcé de reconnaître que les connaissances sur les mécanismes d'absorption intestinale du cholestérol chez cette espèce restent limitées.

I.2 Le transport inverse du cholestérol

Les études épidémiologiques ont clairement établi chez l'homme une corrélation inverse entre les maladies cardiovasculaires et les concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol et apo A-I, apolipoprotéine majeure des HDL (Boden, 2000). Les propriétés anti-athérogènes des HDL et de l'apo A-I sont liées au fait qu'elles jouent un rôle essentiel dans le transport inverse du cholestérol (TIC), mécanisme qui permet le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son élimination par la voie biliaire. Les différentes étapes de ce processus, de la formation des HDL jusqu'à leur capture hépatique, représentent donc une cible majeure dans la prévention et le traitement des maladies cardio-vasculaires.

I.2.1 Métabolisme des HDL

I.2.1.1 Synthèse et sécrétion de l'apo A-I et des HDL naissantes

L'apolipoprotéine A-I représentant environ 70% des apolipoprotéines présentes dans les particules HDL (voir tableau 1), le taux d'expression de l'apo A-I est donc susceptible d'influencer le taux plasmatique de HDL (Rubin et al., 1991). L'expression du gène de l'apo A-I est régulée par une myriade de facteurs nutritionnels, hormonaux et pharmacologiques : lipides, alcool, estrogènes et androgènes, glucocorticoïdes, fibrates, statines, etc. (pour revue, Malik, 2003).

L'apolipoprotéine A-I est sécrétée au niveau hépatique et intestinal sous forme de particules mono-moléculaires, pauvres en lipides, dénommées "lipid-poor apo A-I" (figure 8). Ces particules peuvent également être assimilées à des HDL naissantes, constituées d'apo A-I, riches en phospholipides et pauvres en cholestérol, de forme discoïdale, du fait de l'absence de lipides neutres en leur coeur. Ces particules très denses ayant une migration électrophorétique de type pré- β , sont également appelées pré β -HDL. Outre la sécrétion hépatique et intestinale (voir figure 9), les pré β -HDL sont également produites lors de l'hydrolyse des TRL (chylomicron et VLDL) par la LPL ou lors du catabolisme des α HDL

(dites HDL matures) par les différentes enzymes de transfert ou lipolytiques et les récepteurs impliqués dans le TIC (pour revue, Lewis et al., 2005).

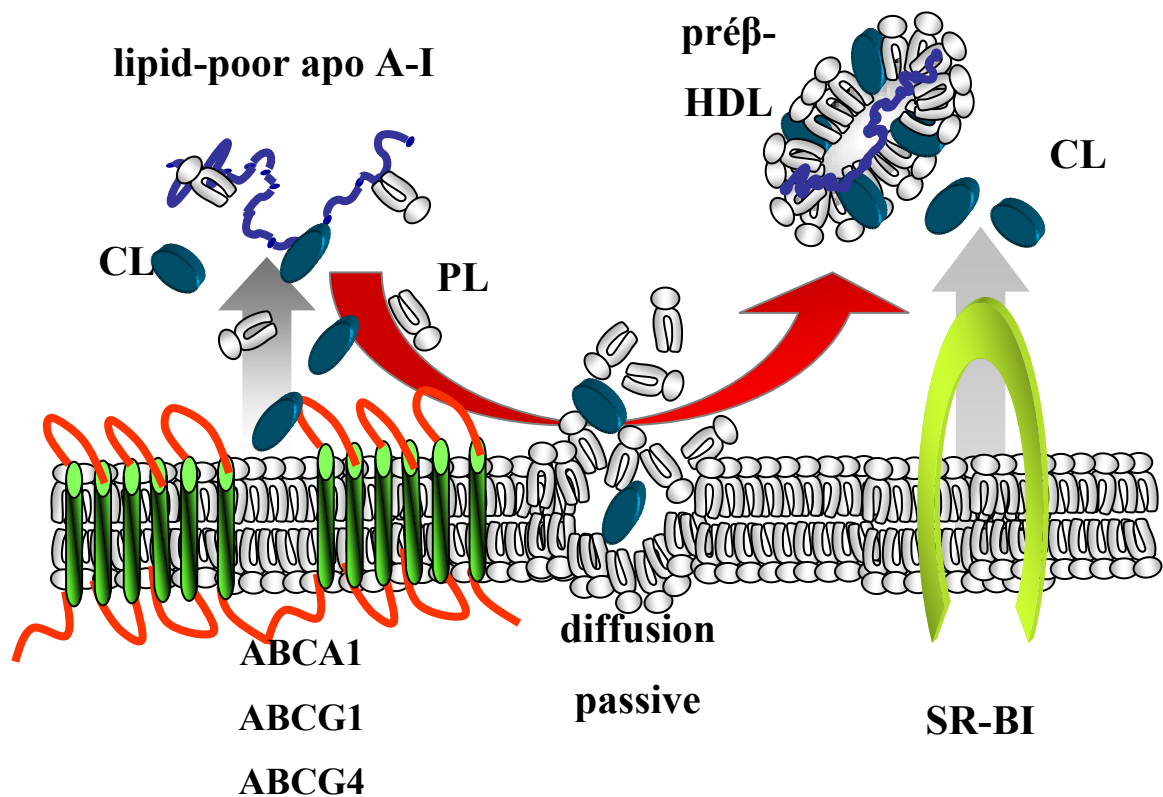


Figure 8. Efflux du cholestérol cellulaire et formation des préβ-HDL

La particule préβ-HDL représente l'accepteur initial du cholestérol des cellules périphériques, ce qui constitue la première phase du TIC. Les mouvements du cholestérol peuvent se faire par simple diffusion (figure 8) vers le milieu extracellulaire puis incorporation dans les préβ-HDL (Rothblat et al., 1986). Mais l'efflux de cholestérol ne se résume pas à un mécanisme passif. Le récepteur ABCA1 est indispensable pour faciliter l'efflux de cholestérol vers les préβ-HDL. La mutation d'ABCA1 provoquant la maladie de Tangier résulte en un sévère déficit en HDL (Remaley et al., 1999). Cette mutation induit en effet un hypercatabolisme de l'apo A-I sans affecter sa production (Bojanovski et al., 1987). L'expression hépatique d'ABCA1 contribuerait majoritairement à la formation des HDL. En effet, une déficience hépato-spécifique d'ABCA1 chez la souris provoque une diminution de

80% du taux de HDL (Timmins et al., 2005). L'absence d'ABCA1 au niveau du macrophage n'a pas de conséquence sur les taux de HDL, mais favorise l'athérosclérose (Aiello et al., 2002). Les récepteurs ABCG1 et ABCG4 joueraient également un rôle dans l'efflux de cholestérol au niveau du macrophage (Wang et al., 2004), les souris ABCG1^{-/-} montrent une accumulation de cholestérol dans les macrophages (Kennedy et al., 2005). Enfin, le récepteur SR-BI participerait également au mécanisme d'efflux du cholestérol. Les souris n'exprimant pas SR-BI dans les macrophages sont en effet plus exposées à l'athérosclérose (van Eck et al., 2004).

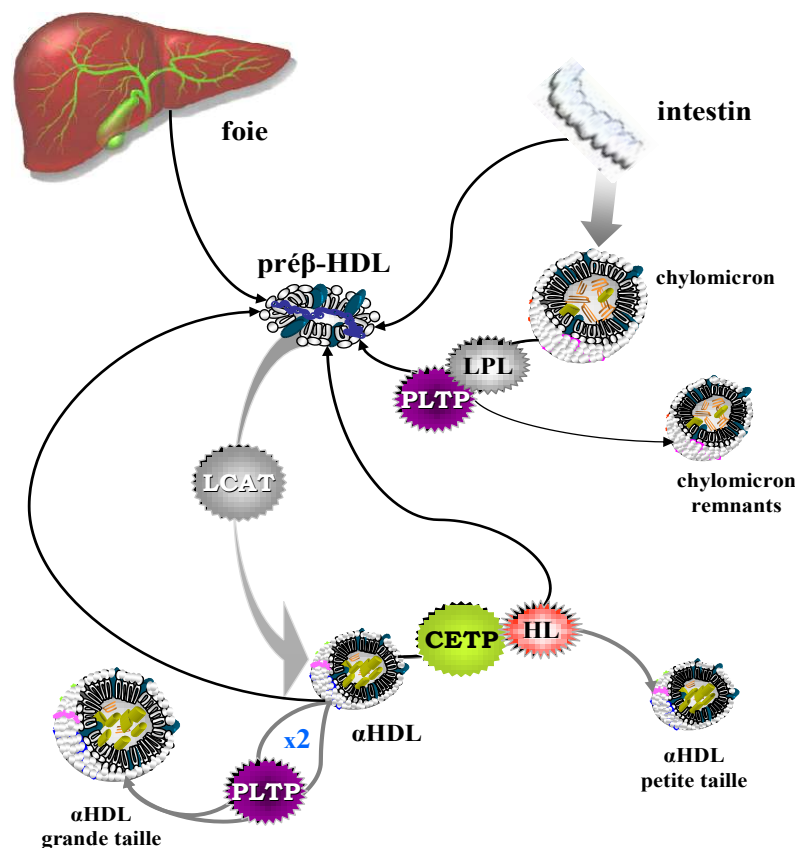


Figure 9. Origine des préβ-HDL et conversion en αHDL chez l'homme
 (CETP, cholesteryl ester transfer protein; HL, hepatic lipase;
 LCAT, lecithin:cholesterol acyl transferase; LPL, lipoprotein lipase;
 PLTP, phospholipid transfer protein)

I.2.1.2 Conversion des préβ-HDL en αHDL

Le cholestérol libre capté par les préβ-HDL subit l'action d'une enzyme plasmatique, la lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) (tableau 2 et figure 9). Synthétisée principalement par le foie, elle s'associe de façon réversible aux HDL, avec l'apo A-I pour principal co-facteur. Elle permet l'estérification du cholestérol libre situé à l'interface lipide/eau. Les esters de cholestérol migrent alors vers le cœur de la particule, transformant les particules discoïdales préβ-HDL en particules sphériques α-HDL (HDL₃ et HDL₂) (Jonas, 2000). L'activité LCAT est critique pour un métabolisme normal des HDL. Chez l'homme des déficits en LCAT (Fish Eye Disease (FED) et déficience en LCAT) sont associés à l'accumulation de cholestérol dans les tissus et les lipoprotéines (pour revue, Kuivenhoven et al., 1997). La FED est associée à des taux réduits d'apo A-I et de HDL-cholestérol suite à un catabolisme élevé de l'apo A-I (Rader et al., 1994). Cependant, l'absence d'activité LCAT n'est cependant que rarement associée à une incidence élevée de pathologies vasculaires.

protéine	localisation	Fonction
LCAT	HDL	Estérification du cholestérol
CETP	HDL	Transfert des esters de cholestérol et des triglycérides
PLTP	HDL	Transfert des phospholipides
LPL	endothélium	Hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et VLDL
HL	endothélium	Hydrolyse des triglycérides des VLDL remnants, des IDL, LDL et HDL
EL	endothélium	Hydrolyse des phospholipides des HDL

Tableau 2. Principales enzymes de transfert et lipases impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme.

I.2.1.3 Remodelage des α HDL par les protéines de transfert et les lipases

Les α HDL enrichies en esters de cholestérol peuvent soit être directement captés par des récepteurs au niveau hépatique soit subir l'action des protéines de transfert (CETP, PLTP) et des lipases (LPL, HL, EL), dont les fonctions sont résumées dans le tableau 2.

Cholesteryl ester transfer protein (CETP)

La cholesteryl ester transfer protein (CETP) est une glycoprotéine hydrophobe produite par le foie et le tissu adipeux, circulant dans le plasma par liaison aux lipoprotéines (Barter et al., 2003). Elle catalyse le transfert des esters de cholestérol situés au cœur des HDL vers les TRL, en échange de triglycérides (figure 10). Son activité peut être inhibée par la LTIP (lipid transfer inhibitor protein) qui empêche la fixation de la CETP aux lipoprotéines et inhibe préférentiellement les échanges avec les LDL (Morton et al., 1997). En catalysant la déplétion en esters de cholestérol et un enrichissement en triglycérides des HDL, la CETP provoque une réduction de la taille de la particule (figure 9) (Lewis et al., 2005). Les transferts entre HDL et TRL augmentent en phase postprandiale (Guerin et al., 2002) et dans les états d'hypertriglycéridémie (Guerin et al., 2001).

Chez l'homme, l'importance de l'activité CETP sur le métabolisme des HDL a été démontrée par la découverte d'une déficience en CETP chez des patients japonais, qui possédaient des taux de HDL-cholestérol très élevés et un catabolisme réduit de l'apo A-I (Ikewaki et al., 1995). Les effets d'une déficience en CETP sur l'athérosclérose ne sont pas bien connus. Pourtant, en reproduisant les mêmes effets que chez les patients déficients en CETP, l'inhibition pharmacologique de l'activité CETP représente une nouvelle cible thérapeutique (Brousseau et al., 2005). Reste à savoir si, dans cette situation, les HDL enrichies en esters de cholestérol participent activement au TIC. Chez l'homme en effet, l'excrétion biliaire des esters de cholestérol des HDL passe, après transfert par la CETP, presque entièrement via la capture hépatique des lipoprotéines à apo B (Ouguerram et al., 2002; Schwartz et al., 2004).

Phospholipid transfer protein (PLTP)

La phospholipid transfer protein (PLTP) transfère les phospholipides de surface des TRL vers les HDL lors de l'hydrolyse des triglycérides (Huuskonen et al., 2001). Chez la souris, la déficience en PLTP provoque une baisse des taux de HDL et d'apo A-I, du fait d'un catabolisme élevé (Jiang et al., 1999). Les souris PLTP transgéniques ont des taux élevés de préβ-HDL, d'apo A-I et de phospholipides. La PLTP provoque un remodelage des HDL en augmentant leur taille par fusion des particules (figure 9) avec un relargage de "lipid-poor apo A-I" (Huuskonen et al., 2001). La composition lipido-apolipoprotéique des HDL semble jouer un rôle important dans leur remodelage par la PLTP. Il est beaucoup plus important lorsque les HDL sont enrichies en triglycérides (Rye et al., 1998). Chez l'homme néanmoins, le rôle physiologique et pathologique de la PLTP reste peu compris.

Lipoprotein lipase (LPL)

La lipoprotein lipase (LPL) est exprimée par de nombreux tissus, mais on la trouve majoritairement au niveau musculaire et adipeux (pour revue, Preiss-Landl et al., 2002). Transférée à la surface des cellules endothéliales, où elle est associée aux protéoglycanes, elle peut être décrochée par administration intra-veineuse d'héparine. La LPL a pour principale activité l'hydrolyse des triglycérides, avec pour substrat préférentiel les TRL, formant ainsi des remnants (figure 9). Elle initie la cascade de lipolyse générant les IDL et LDL (figure 10). Elle est activée par l'apo C-II (Catapano, 1982) et inhibée par l'apo C-III (Wang et al., 1985). L'hydrolyse des TRL provoque aussi la libération de cholestérol libre, de phospholipides et d'apolipoprotéines qui sont alors récupérés par les HDL. Par cette action, la LPL influence les taux de HDL-cholestérol et HDL-apo A-I. La concentration plasmatique en HDL-C est en effet positivement corrélée avec l'activité LPL (Tornvall et al., 1995). Chez la souris qui n'exprime normalement pas la CETP, cette corrélation n'est évidente que sur les souches CETP transgéniques, ce qui suggère que la présence des transferts entre HDL et TRL seraient nécessaires aux effets de la LPL (Clee et al., 1997). Par ailleurs, la déficience en LPL optimise les échanges catalysés par la CETP, en provoquant un enrichissement des HDL en triglycérides, ce qui rend ces particules plus instables et plus facilement catabolisables (Kaser et al., 2003).

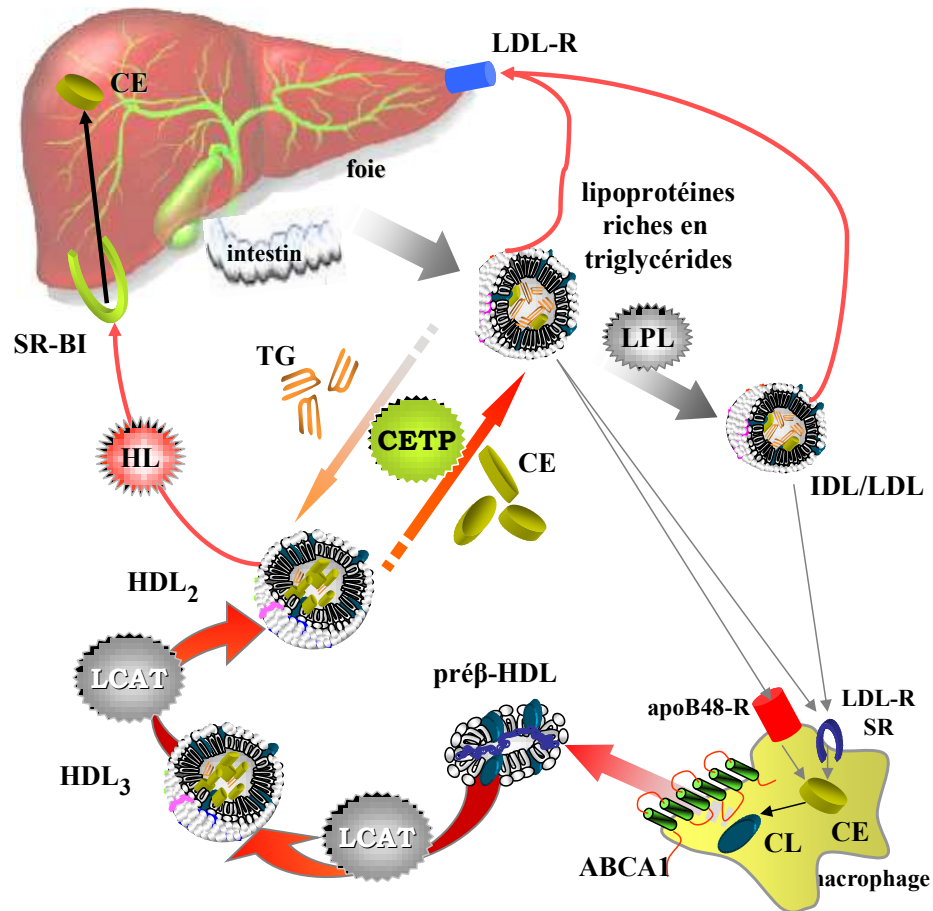


Figure 10. Transport inverse du cholestérol chez l'homme

Hepatic lipase (HL)

L'hépatique lipase (HL) est synthétisée par le foie et se fixe à la surface des capillaires hépatiques grâce aux protéoglycanes. Ainsi, comme la LPL, elle est décrochée par l'héparine. Elle intervient dans la cascade lipolytique en hydrolysant les triglycérides des IDL et des LDL. La HL hydrolyse préférentiellement les triglycérides des HDL et convertit ainsi les HDL de grande taille ("large HDL") en HDL de taille plus réduite (figure 9), HDL remnants, pré-β-HDL et "lipid-poor apo A-I". L'effet de la HL sur les HDL dépend fortement de leur composition lipidique. L'enrichissement en triglycérides et l'appauvrissement en esters de cholestérol, via l'importante activité CETP observé dans les cas d'hypertriglycéridémie,

active fortement le remodelage et le catabolisme des HDL par la HL (pour revue, Rashid et al., 2003). Contrairement à la LPL, une corrélation inverse existe entre l'activité de la HL et les taux de HDL-cholestérol chez l'homme (Blades et al., 1993). Les patients déficients en HL ont en effet une augmentation modérée du HDL-cholestérol, avec des HDL de grande taille enrichies en triglycérides (Connelly et al., 1998).

Endothelial lipase (EL)

L'endothelial lipase (EL) a été découverte en 1999 par Jaye et al., 1999. Synthétisée par les cellules endothéliales et exprimée à leur surface, elle possède une activité phospholipase sur les HDL et une activité d'hydrolyse des triglycérides mineure comparée à la LPL et la HL. Chez la souris, la surexpression de l'EL diminue les taux de HDL-cholestérol et d'apo A-I suite à un catabolisme élevé (Maugeais et al., 2003). Cependant, le rôle de l'EL chez l'homme et ses effets sur le TIC restent à déterminer, même si l'on a montré que des variations du gène ont des effets sur la concentration en HDL-cholestérol (deLemos et al., 2002).

I.2.1.4 Catabolisme des HDL et capture sélective du HDL-cholestérol

Les reins, les tissus stéroïdogènes et le foie sont les principaux sites du catabolisme des HDL. Au niveau rénal, l'apo A-I ("lipid-poor apo A-I") serait catabolisée par le système cubilin/megalin (Hammad et al., 1999). Au niveau du foie, l'existence de récepteurs favorisant l'endocytose des HDL et leur dégradation (captation "holoparticulaire") reste énigmatique malgré la découverte de nombreux candidats: AI-BP, HB1, HB2, HBP (Fidge, 1999). Plus récemment, la chaîne β de l'ATP synthase fut identifiée à la surface des hépatocytes comme le récepteur assurant la captation holoparticulaire des HDL, avec pour activateur le nucleotide receptor P2Y(13) (Jacquet et al., 2005). Les effets physiologiques de ce récepteur restent à démontrer.

L'autre mécanisme majeur du catabolisme des HDL est la capture sélective du HDL-cholestérol. Le scavenger receptor class B type I (SR-BI), de la super famille des scavenger receptors, lie les HDL avec une forte affinité et assure la capture sélective des lipides des HDL, les esters de cholestérol et le cholestérol libre étant les plus efficacement captés (Thuahnai et al., 2001). Les lipides sont captés en deux étapes : liaison de la particule HDL au récepteur, puis diffusion des lipides dans la membrane plasmique sans internalisation (et donc sans dégradation) de la particule. Néanmoins, ce mécanisme favorise le catabolisme des HDL et de l'apo A-I comme on a pu l'observer sur les souris SR-BI transgéniques (Zhang et al., 2005). Les particules HDL déchargées en cholestérol sont en effet plus facilement catabolisées (Kozarsky et al., 1997). Par ailleurs, la composition lipidique des HDL influence l'efficacité du mécanisme. En effet, l'enrichissement des HDL en triglycérides provoque une diminution de la capture sélective des esters de cholestérol via SR-BI (Greene et al., 2001). La conformation de l'apo A-I, la taille des HDL et le remodelage par la CETP et la HL ont également une influence majeure sur ce phénomène (Lewis et al., 2005).

SR-BI joue un rôle crucial dans l'activité anti-athérogène du TIC (figure 10). Chez les souris surexprimant SR-BI au niveau hépatique, l'excrétion biliaire du cholestérol issu des macrophages est très significativement augmentée comparé à celle des souris sauvages ou SR-BI^{-/-} (Zhang et al., 2005). La baisse significative des taux de HDL-cholestérol et d'apo A-I chez ces souris traduit donc l'efficacité optimale du TIC via la surexpression hépatique de SR-BI, avec une excrétion biliaire du cholestérol considérablement plus élevée (Ji et al., 1999). L'optimisation du transport du cholestérol via SR-BI représente donc une importante

voie thérapeutique pour prévenir les maladies cardio-vasculaires chez l'homme. Cette stratégie est d'autant plus pertinente que, chez l'homme, le retour du cholestérol vers le foie se fait très majoritairement via les lipoprotéines à apo B (Ouguerram et al. 2002; Schwartz et al., 2004). Or, le cholestérol de ces lipoprotéines, contrairement à celui des HDL, n'est pas majoritairement sécrété dans la bile (figure 11). Capté par le LDL-récepteur, il est au contraire utilisé pour le recyclage du cholestérol, soit pour la synthèse des acides biliaires soit pour la remise en circulation après ré-estérification (Schwartz et al., 1978; Cohen, 1999).

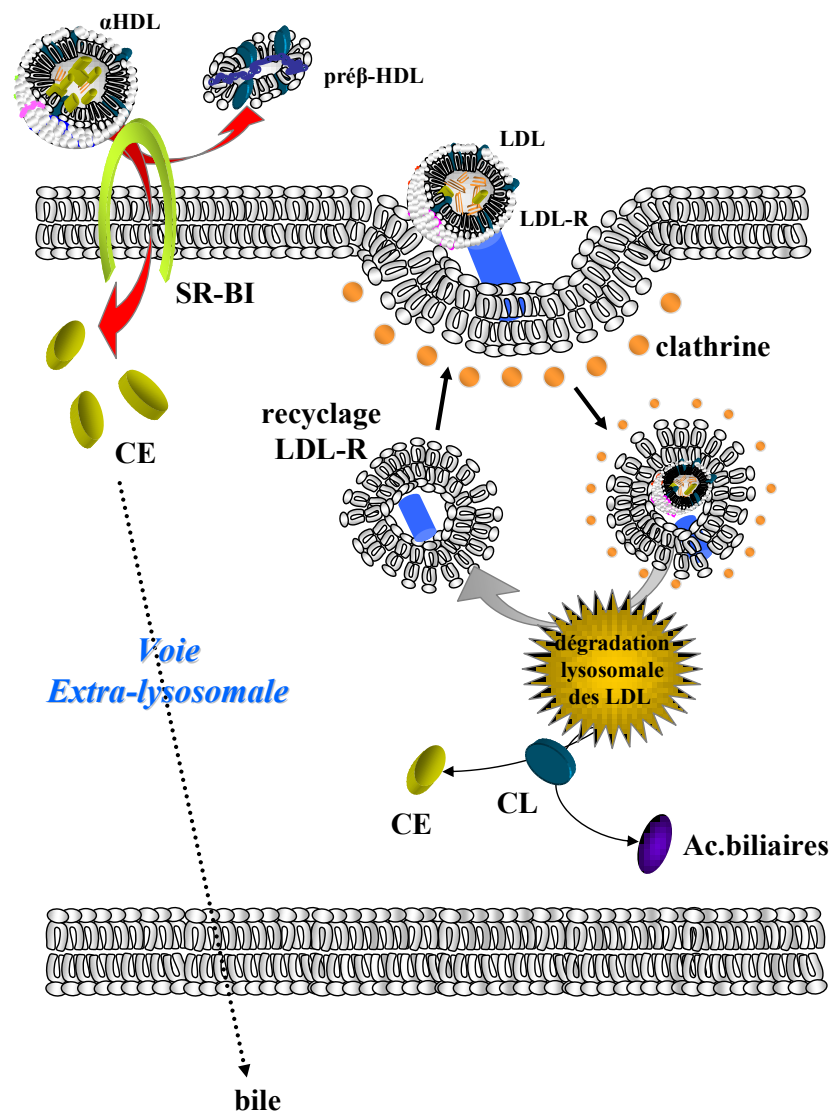


Figure 11. Capture hépatique du cholestérol

I.2.2 Rôle des récepteurs nucléaires dans le transport inverse du cholestérol

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines et le transport inverse du cholestérol. A l'heure actuelle, le développement de nouvelles thérapies s'appuie sur l'activation de ces récepteurs pour optimiser le transport inverse du cholestérol.

PPARs

La sous-famille des peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) comprend trois protéines : le PPAR α (NR1C1) exprimé au niveau hépatique, rénal et musculaire, le PPAR β/δ (NR1C2) exprimé de façon ubiquitaire et le PPAR γ (NR1C3) exprimé dans le tissu adipeux. Comme indiqué sur la figure 5, ces récepteurs agissent sur les gènes cibles grâce à une hétérodimérisation avec le RXR (retinoid X receptor) et une fixation sur les éléments de réponse aux PPARs (PPAR-response elements, PPREs). Les PPARs ont pour ligands les acides gras et leurs dérivés, les fibrates (pour le PPAR α) et les thiazolidinediones (pour le PPAR γ) (pour revue, Torra et al., 2001).

Au niveau des macrophages, les agonistes des PPAR α et PPAR γ stimulent l'expression de SR-BI et ABCA1 (Chinetti et al., 2000). La stimulation de l'expression d'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol se fait via une activation de LXR α , elle-même induite par le PPAR γ (Chawla et al., 2001). Au niveau hépatique, le PPAR α active l'expression des apo A-I et A-II ce qui favorise la production de HDL. Le PPAR α , en activant le LXR α , agit également sur la synthèse des acides biliaires via l'expression de l'enzyme CYP7A1 (Torra et al., 2001). L'activation du PPAR α et du PPAR γ diminue les taux de triglycérides grâce à l'activation de la LPL et la diminution des taux d'apo C-III, inhibiteur de l'activité LPL (Staels et al., 1998 ; Nagashima et al., 2005). Cette action hypotriglycéridémiante aurait un effet indirectement bénéfique sur le métabolisme des HDL. Enfin, le PPAR γ activerait l'expression de SR-BI hépatique (Malerod et al., 2002), alors que le PPAR α la réprimerait (Mardones et al., 2003).

Les données sur le PPAR β/δ sont pour l'instant contradictoires. Chez la souris, le PPAR β/δ ne montre pas d'effet significatif sur l'athérogénèse, comparé aux PPAR α et

PPAR γ (Li et al., 2004). En revanche, l'agoniste GW501516 a révélé un effet positif du PPAR β/δ sur le TIC chez le singe et les macrophages en culture (Oliver et al., 2001).

LXRs

Les récepteurs LXRs (LXR α et LXR β) activent, au niveau hépatique, de nombreux gènes qui favorisent l'élimination du cholestérol, notamment l'enzyme CYP7A1 et les récepteurs ABCG5 et ABCG8 (Repa et al., 2002). En effet, chez les souris LXR $^{-/-}$ nourries par un régime riche en cholestérol, une accumulation massive de cholestérol s'observe au niveau hépatique (Peet et al., 1998). Le métabolisme des TRL est aussi sous l'influence des récepteurs LXRs, qui activent l'expression de la LPL au niveau des macrophages et du foie (Zhang et al., 2001), de la PLTP (Mak et al., 2002) et du cluster apo E/C-I/C-IV/C-II au niveau des macrophages (Mak et al., 2002). L'expression des récepteurs ABCA1, ABCG1 et ABCG4 des macrophages est également stimulée par les LXRs.

L'effet positif des LXRs sur le TIC a été mis en évidence chez la souris : l'administration de GW3965, agoniste des LXRs, augmente très significativement l'excrétion biliaire du cholestérol des macrophages (Naik et al., 2005). Malgré leurs effets bénéfiques, les récepteurs LXRs stimulent également le facteur de transcription SREBP-1c (sterol response element binding protein 1c), ce qui augmente la synthèse des acides gras libres et le taux de triglycérides circulant (Schultz et al., 2000). D'autre part, les LXRs augmenteraient les taux de LDL-cholestérol chez les espèces exprimant la CETP comme le hamster ou le singe (Groot et al., 2005). L'utilisation des agonistes LXRs chez l'homme nécessite donc des études pré-cliniques plus approfondies.

FXR

Exprimé au niveau intestinal et hépatique, le FXR influence principalement l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires, comme CYP7A1 ou BSEP. Les acides biliaires (acide cholique et chenodéoxycholique) et leurs intermédiaires sont d'ailleurs des ligands physiologiques du FXR (pour revue, Ory, 2004). Le FXR agit également sur le métabolisme des lipoprotéines. Les souris FXR $^{-/-}$ présentent en effet une élévation des taux de triglycérides et une augmentation du HDL-cholestérol, comparées à des souris sauvages

(Lambert et al., 2003). FXR influence la capture sélective du HDL-cholestérol en stimulant l'expression de SR-BI au niveau hépatique (Lambert et al., 2003).

I.2.3 Lipoprotéines et transport inverse du cholestérol chez le chien

Même si l'espèce canine a été et reste sous-exploitée pour étudier le transport inverse du cholestérol, des études sur le métabolisme des lipoprotéines chez le chien sont néanmoins disponibles et montrent des différences importantes par rapport à l'homme. Les principales caractéristiques des lipoprotéines et apolipoprotéines connues chez le chien sont présentées sur la figure 12 et dans le tableau 3, respectivement.

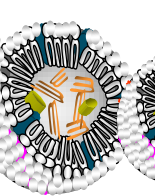
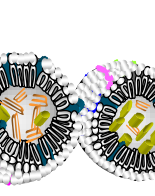
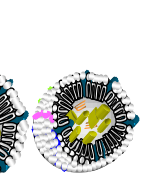
	chylomicron	VLDL	LDL	HDL ₁	HDL ₂
					
diamètre (Å)	900-3000	260-900	160-250	100-350	55-85
densité (g/mL)	<0.93	0.93-1.006	1.006-1.087	1.025-1.10	1.07-1.21
protéine*	3	14	27	22	43
apolipoprotéines majeures	B48, A, C, E	B100, B48, A, C, E	B100, B48	A-I, E	A-I, E
TG*	90	68	23	2	1
CE*	1	2	17	30	13
CL*	2	6	5	5	5
PL*	4	10	28	41	36

Figure 12. Les différentes classes de lipoprotéines chez le chien

(d'après Zilversmit, 1965; Malhey, 1974; Maldonado, 2001)

(* % masse; CE, cholesteryl esters; CL, cholestérol; PL, phospholipides, TG, triglycérides)

Les lipoprotéines

Comme pour la souris et le rat, le chien est caractérisée par une très faible voire une absence d'activité CETP, tant *in vitro* (Tsutsumi et al., 2001) qu'*in vivo* (Bailhache et al., 2004). En conséquence, le HDL-cholestérol représente 86% du cholestérol plasmatique (Maldonado et al., 2001; Bailhache et al., 2003), tandis que les fractions LDL et VLDL ne représentent que 11% et 3%, respectivement. Les pré β -HDL, synthétisées par le foie et l'intestin (Wong et al., 1995), s'enrichissent en esters de cholestérol, via l'activité LCAT, pour former des HDL₂. L'activité CETP étant absente chez le chien, l'activité LCAT aboutit à la formation de particules HDL₁ de grande taille et riches en apo E, spécifique à l'espèce canine (Mahley et al., 1974). Dans le cas d'hypercholestérolémie canine, on distingue une troisième classe, les HDL_C, riches en cholestérol et apo E, appauvries en apo A-I (Gordon et al., 1983). En outre, le profil lipidique du chien se caractérise par une absence d'IDL et un chevauchement des densités des LDL et HDL₁.

Les apolipoprotéines

Le HDL-cholestérol étant majoritaire, les taux d'apo A-I (de 2 à 4 g/L) sont 2 à 3 fois ceux mesurés chez l'homme (Downs et al., 1993). L'apo E représente la seconde apolipoprotéine majeure des HDL. La séquence de l'apo A-II a également été rapportée chez le chien (Datta et al., 1987).

Les concentrations plasmatiques en apo B seraient de 0,5g/L chez le chien (Downs et al., 1993). Contrairement à l'homme, les VLDL d'origine hépatique contiennent de l'apo B48 du fait d'un mécanisme d'editing de l'ARNm de l'apo B dans le foie, également observé chez la souris et le rat (Greeve et al., 1993). La présence d'apoB48 favoriserait un catabolisme élevé des VLDL (Greeve et al., 1993 ; Bailhache et al., 2004), comme le suggèrent les études portant sur les isoformes tronquées de l'apoB chez l'homme (Vega et al., 1987; Welty et al., 1997).

apolipoprotéine	tissu	distribution	fonction
A-I	Foie (85%), intestin (15%)	Chylomicron, HDL	Structurelle, activateur de la LCAT, efflux de cholestérol
A-II	Foie ?	HDL ?	?
A-IV	intestin	Chylomicron, HDL, HDL _C	Efflux du cholestérol, activateur de la LCAT, métabolisme TRL
B100	Foie	VLDL, LDL	Structurelle, synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du LDL-receptor
B48	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL	Structurelle, synthèse et sécrétion des chylomicrons et des VLDL hépatiques
C-I	Foie	Chylomicron, VLDL, HDL	activateur de la LCAT
C-II	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Activateur de la LPL ?
C-III	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibiteur de la LPL ?
E	Foie, cerveau, rate	Chylomicron, VLDL, HDL ₁ , HDL _C	Ligand du récepteur à l'apo E et du LDL-receptor

Tableau 3. Expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines canines (d'après Datta et al., 1987 ; Downs et al., 1993 ; Luo et al., 1989) .

Les protéines de transfert et les lipases

Comme on l'a mentionné plus haut, le chien est caractérisé par une absence de CETP (Tsutsumi et al., 2001 ; Bailhache et al., 2004). Les protéines de transfert LCAT et PLTP ont été identifiées chez le chien, avec des activités supérieures à celles mesurées chez l'homme

(Guyard-Dangremont et al., 1998 ; Ouguerram et al., 2004). Bien que la présence de la LPL (Wang et al., 1992) et de la HL (Chuang et al., 1985) soit rapportée, l'endothélial lipase (EL) n'a pas été identifiée chez le chien.

Les récepteurs

Les données concernant les récepteurs sont plus réduites. Néanmoins, deux études récentes ont mis en évidence l'existence des récepteurs ABCA1, ABCG5/ABCG8 et SR-BI (Lee et al., 2003 ; Tauscher et al., 2003) dans les cellules épithéliales canines de la vésicule biliaire. Sur ce modèle cellulaire, l'expression basolatérale d'ABCA1 est stimulée par le cholestérol et les récepteurs nucléaires LXR/RXR (Lee et al., 2003). L'efflux de cholestérol conséquent est d'autant plus important en présence d'apolipoprotéine A-I (Lee et al., 2003). Même si ces observations sont encourageantes, aucune autre étude sur le rôle de ces récepteurs dans le TIC du chien n'a été publiée. Au niveau hépatique, le LDL-receptor ou apo B/E receptor, de masse égale à 130kD, lie les LDL et les HDL contenant l'apo E (Hui et al., 1986). Concernant l'expression hépatique de SR-BI, aucune étude n'est pour l'instant disponible chez le chien.

Le transport inverse du cholestérol chez le chien

D'après ces données, certes limitées, on peut néanmoins dresser un schéma hypothétique sur le transport inverse du cholestérol (figure 13). Ainsi, les pré β -HDL participeraient à l'efflux de cholestérol libre au niveau des cellules périphériques, grâce à la présence d'ABCA1. Du fait de l'absence d'activité CETP, l'activité LCAT aboutit à la formation de HDL₁ de grande taille et enrichies en apo E. Ces HDL₁ sont ensuite captées par les LDL-receptors hépatiques. Même si l'expression de SR-BI au niveau du foie n'a pas été démontrée, la capture sélective du HDL-cholestérol serait néanmoins quantitativement très importante chez le chien (Ouguerram et al., 2004). En effet, par des études basées sur l'utilisation d'isotopes stables, nous avons pu mettre en évidence que la capture sélective des esters de cholestérol des HDL (HDL-CE) représente 60% du catabolisme total du HDL-CE. La capture sélective du HDL-CE est de 2 à 3 fois supérieure à celle d'autres espèces telles que le rat, la souris, le lapin et l'homme (Ouguerram et al., 2004).

Malgré un nombre d'investigations limitées et des différences notables par rapport à l'homme, le chien est cependant d'un intérêt potentiel pour étudier le transport inverse du cholestérol. En effet, le chien sain apparaît comme une espèce non prédisposée à l'athérosclérose, puisque ce phénomène est uniquement rapporté dans quelques cas pathologiques comme les infections chlamydiales (Sako et al., 2002), l'hypothyroïdie, le diabète de type I, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie (Liu et al., 1986). Cette résistance à l'athérosclérose suggère une efficacité accrue du TIC chez le chien. En se basant sur nos mesures de la capture sélective du HDL-CE, l'espèce canine représenterait donc un modèle intéressant pour étudier la voie anti-athérogène passant par SR-BI.

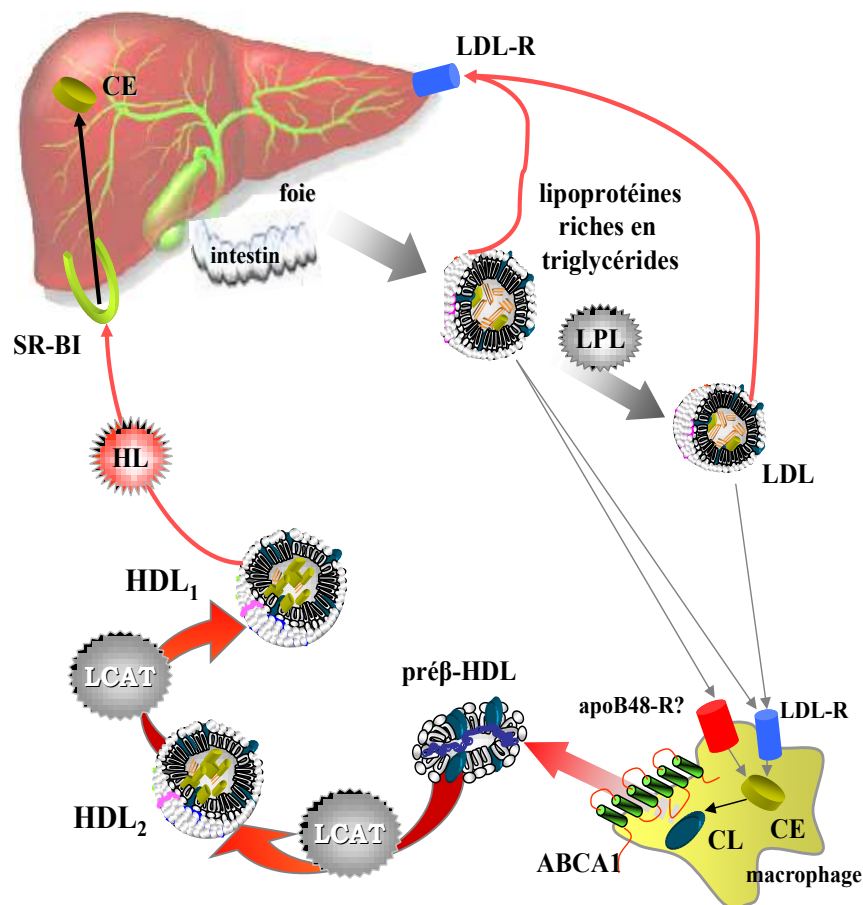


Figure 13. Transport inverse du cholestérol chez le chien

II. EFFETS DE L'INSULINORÉSISTANCE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE ET LE TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL

II.1 Généralités sur le syndrome d'insulinorésistance

II.1.1 Définition du syndrome d'insulinorésistance

L'insulinorésistance peut être le plus simplement définie comme une réponse anormalement basse des cellules cibles (cellules β du pancréas, cellules hépatiques et musculaires, adipocytes) à des concentrations normales ou élevées d'insuline. En réponse à l'insulinorésistance, l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas induit une hyperinsulinémie compensatrice pour maintenir une glycémie normale (pour revue, Cefalu, 2001). A long terme, l'insulinorésistance au niveau de la cellule β pancréatique aboutit à une sécrétion d'insuline insuffisante, conduisant à l'hyperglycémie et au diabète de type II (Virkamaki et al., 1999).

Dans des conditions physiologiques normales, l'insuline agit tant sur le métabolisme glucidique (stimulation de la glycolyse, synthèse de glycogène, inhibition de la néoglucogenèse et de la production de glucose) que sur le métabolisme lipidique (inhibition de la lipolyse, activation de la lipogenèse via la synthèse d'acides gras libres et de triglycérides) (Wilcox, 2005). L'insulinorésistance et l'altération des métabolismes glucidique et lipidique conduisent à l'apparition d'une multitude de désordres métaboliques, formant le syndrome d'insulinorésistance (ou syndrome métabolique) : hyperinsulinémie, intolérance au glucose et hyperglycémie, dyslipidémie, hypertension, dysfonction de l'endothélium vasculaire, activité pro-thrombotique et athérosclérose (Eckel et al., 2005). Associés, ces désordres métaboliques augmentent considérablement le risque cardiovasculaire (Isomaa et al., 2001).

Bien que les premières descriptions du syndrome métabolique remontent jusqu'aux années 1920 (Kylin, 1923), la première initiative pour définir cliniquement ce syndrome date de 1998 (Alberti et al., 1998), suite à une consultation de l'OMS. Ensuite, d'autres définitions furent publiées par l'EGIR (European Group for the study of Insulin Resistance) (Balkau et al., 1999) et le NCEP:ATP III (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment

Panel III) (Executive summary of the third NCEP, 2001). Ces définitions, présentées dans le tableau 4, regroupent les composantes essentielles du syndrome d'insulinorésistance (intolérance au glucose, obésité, dyslipidémie et hypertension). Contrairement à la définition NCEP:ATP III, l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose et l'insulinorésistance sont des composantes essentielles des définitions OMS et EGIR. On peut distinguer une finalité clinique dans la définition NCEP:ATP III, alors que celle de l'OMS se présente comme un outil de recherche (Eckel et al., 2005) qui se base sur des méthodes de mesure d'insulinorésistance difficilement applicables en épidémiologie.

OMS	EGIR	NCEP:ATP III
Diabète ou hyperglycémie à jeun ou intolérance au glucose ou insulinorésistance mesurée par clamp euglycémique hyperinsulinémique + 2 ou plus des paramètres suivants : ●Obésité : IMC>30 ou ratio taille/hanche >0,9 (homme) ou >0,85 (femme) ●Dyslipidémie : triglycérides >1,7mM ou HDL- C<0,9mM (homme) ou <1,0mM (femme) ●Hypertension : pression artérielle>140/90 mmHg ●Microalbuminurie : excretion>20µg/min	Insulinorésistance ou hyperinsulinémie à jeun + 2 ou plus des paramètres suivants : ●Obésité : tour de taille >94cm (homme) ou >80cm (femme) ●Dyslipidémie : triglycérides >2,0mM ou HDL- C<1,0mM ●Hypertension : pression artérielle>140/90 mmHg et/ou traitement ●Glycémie à jeun>6,1mM	3 ou plus des paramètres suivants : ●Obésité : tour de taille >102cm (homme) ou >88cm (femme) ●Dyslipidémie : triglycérides >1,7mM ou HDL- C<1,0mM (homme) ou <1,3mM (femme) ●Hypertension : pression artérielle>135/85 mmHg et/ou traitement ●Glycémie à jeun>6,1mM

Tableau 4. Comparaison des définitions du syndrome métabolique (EGIR, European Group for the study of Insulin Resistance ; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol ; IMC, indice de masse corporelle ; NCEP:ATP III, National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III).

Parmi ces méthodes, la technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique demeure la méthode de référence ("gold standard") pour mesurer la sensibilité à l'insuline d'un individu (deFronzo et al., 1979). Cette technique consiste à réaliser une perfusion constante d'insuline afin d'obtenir un plateau hyperinsulinémique. La glycémie est maintenue normale et constante au moyen d'une perfusion de glucose à débit variable. La quantité de glucose perfusée reflète alors directement la sensibilité à l'insuline. D'autres tests basés sur la tolérance au glucose permettent également de diagnostiquer le syndrome métabolique. Le test intraveineux de tolérance au glucose, développé par Bergman, permet d'évaluer des indices d'intolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline mais il nécessite l'utilisation d'analyses mathématiques complexes (Bergman et al., 1981). Le test de tolérance oral au glucose (Stumvoll et al., 2000), plus facile à réaliser, reste néanmoins décevant quant à la reproductibilité de cette méthode (Bugianesi et al., 2005). Du point de vue clinique et épidémiologique, des mesures statiques plus commodes sont utilisées. Le HOMA, pour Homeostatic model assessment, calculé à partir des valeurs d'insulinémie et de glycémie à jeun, est le plus utilisé (Wallace et al., 2004).

II.1.2 Physiopathologie de l'insulinorésistance

II.1.2.1 Altération de la voie de signalisation de l'insuline

L'effet biologique de l'insuline dépend d'une suite de réactions intracellulaires (figure 14). La liaison de l'insuline avec son récepteur spécifique induit une auto-phosphorylation du récepteur, la phosphorylation des protéines IRS (insulin receptor substrates) 1 et 2, puis l'activation en cascade de kinases (phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K), protein kinase B ou akt). Cette cascade de réactions aboutit à la translocation des vésicules contenant le transporteur de glucose GLUT-4 du pool intracellulaire vers la membrane plasmique. Le transporteur GLUT-4 peut ainsi faciliter le transport du glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (pour revue, Virkamaki et al., 1999).

La manifestation clinique de l'insulinorésistance résulterait donc d'une défaillance dans une ou plusieurs étapes de cette cascade de réactions. Dans l'obésité et le diabète de type II, de nombreux facteurs tels que l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et les acides gras libres ont été impliqués dans l'altération de la voie de

signalisation de l'insuline (Virkamaki et al., 1999). Bien que les mécanismes ne soient pas clairement établis, les connaissances actuelles semblent indiquer une altération des activités IRS-1 et phosphatidylinositol-3 kinase, dans le muscle (Bjornholm et al., 1997), l'adipocyte (Rondinone et al., 1997) et l'hépatocyte (Rojas et al., 2003).

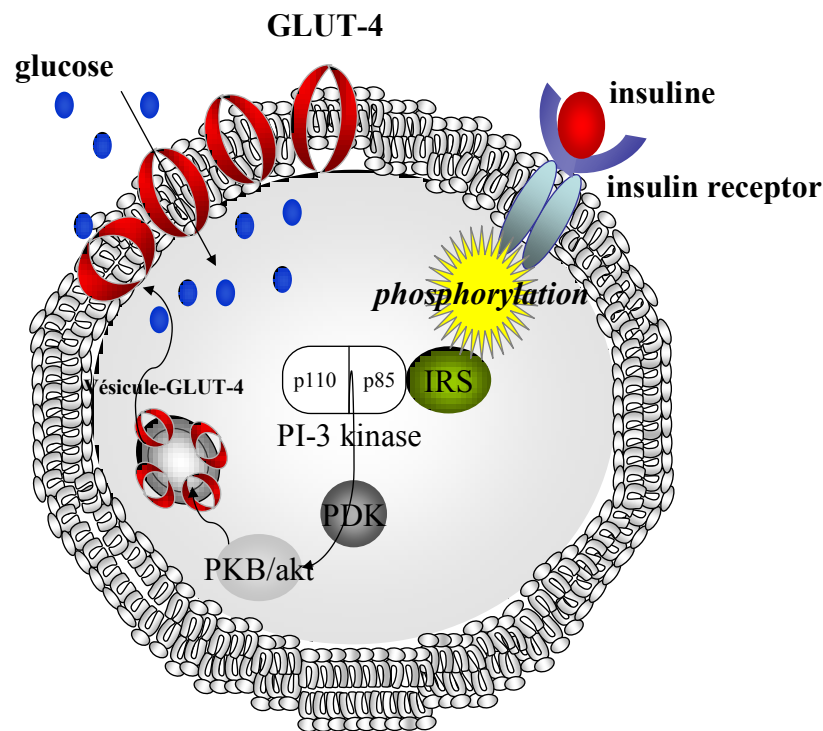


Figure 14. Voie de signalisation de l'insuline
 (GLUT-4, glucose transporter 4; IRS, insulin receptor substrate;
 PDK, phosphatidylinositol-3 kinase; PKB, protein kinase B)

II.1.2.2 Obésité

Bien que l'insulinorésistance ait aussi été décrite chez des sujets non-obèses (Ruderman, 1998; Umeh et al., 2005), l'obésité et l'accumulation de graisse associée semblent exacerber les effets du syndrome d'insulinorésistance (Aronne et al., 2002). Cependant, la répartition des graisses au niveau corporel jouerait un rôle important. Vague fut le premier à décrire une morbidité accrue chez les obèses de type androïde comparés aux obèses de type gynoïde (Vague, 1947). Dans l'obésité abdominale (androïde), la masse du tissu adipeux viscéral

détermine le taux de TNF α et d'interleukine 6 (IL-6), adipokines reconnues comme favorisant l'insulinorésistance (Hotamisligil et al., 1993 ; Fried et al., 1998).

Par ailleurs, le tissu adipeux viscéral, riche en récepteurs β -adrénergiques, est plus sensible à la stimulation de la lipolyse et posséderait une activité lipolytique plus importante (Arner, 1995). La libération accrue d'acides gras libres du tissu adipeux viscéral vers le foie via la veine porte favoriserait alors l'insulinorésistance hépatique (hypothèse dite "portale"), (Frayn, 2000). Sur des hépatocytes de rat, il a été montré que les acides gras inhibaient la liaison de l'insuline à son récepteur, sa dégradation et ses effets biologiques (Svedberg et al., 1990). Les acides gras libres participent en outre à la production hépatique de glucose, contribuant ainsi à l'intolérance au glucose (Ferrannini et al., 1983). Cette théorie portale a été récemment étudiée chez le chien : un régime modérément enrichi en graisse induit d'une part une augmentation de l'accumulation lipidique et de la lipolyse dans le tissu adipeux viscéral et d'autre part une augmentation de l'expression hépatique de la glucose-6-phosphatase et de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), enzymes impliquées dans la néoglucogenèse (Kabir et al., 2005).

II.1.2.3 Intolérance au glucose

L'insulinorésistance se traduit par un effet diminué de l'insuline sur l'inhibition la production hépatique du glucose et sa captation par les tissus insulino-sensibles. Dans ce cas, la glycémie est maintenue normale tant que l'hyperinsulinémie compensatrice est assurée par les cellules β pancréatiques. Néanmoins, l'exposition prolongée de celles-ci à des concentrations élevées d'acides gras libres aboutit à une diminution de la sécrétion d'insuline, chez le rat (Lee et al., 1994), soulignant ainsi la notion de lipotoxicité des acides gras libres et l'implication de ces derniers dans l'intolérance au glucose et l'apparition du diabète de type II (Yaney et al., 2003).

Le rétrocontrôle de l'insuline sur sa propre sécrétion jouerait également un rôle dans l'apparition du diabète de type II. Chez la souris, la délétion du récepteur à l'insuline dans le muscle n'induit pas d'hyperglycémie (Bruning et al., 1998) alors qu'une délétion spécifique aux cellules β conduit progressivement à l'intolérance au glucose et au diabète (Kulkarni et al., 1999). Ainsi, l'hyperinsulinémie et les concentrations élevées en acides gras libres

représentent un stress important sur les cellules β pancréatiques, ce qui favoriserait l'intolérance au glucose et la progression vers le diabète de type II.

II.1.2.4 Hypertension, dysfonction endothéliale et thrombogénèse

Chez des sujets sains, l'insuline administrée par voie intraveineuse a montré des effets vasodilatateurs (Steinberg et al., 1994). Ainsi, l'insulinorésistance atténuerait cet effet bénéfique de l'insuline (Tooke et al., 2000). Les acides gras libres peuvent également contribuer à la vasoconstriction (Tripathy et al., 2003). Il est clairement établi qu'une dysfonction endothéliale se produit secondairement à l'hyperinsulinémie et l'insulinorésistance (Cefalu, 2001). La vasodilatation médiée par le monoxyde d'azote (NO) est altérée chez les diabétiques de type II (Williams et al., 1996). Dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (figure 15), la voie phosphatidylinositol-3 kinase stimulant la synthèse de NO serait altérée lors de l'insulinorésistance, alors que la voie mitogen-activated protein kinase (MAPK) serait optimale, voir stimulée (Cusi et al., 2000 ; Pessin et al., 2000).

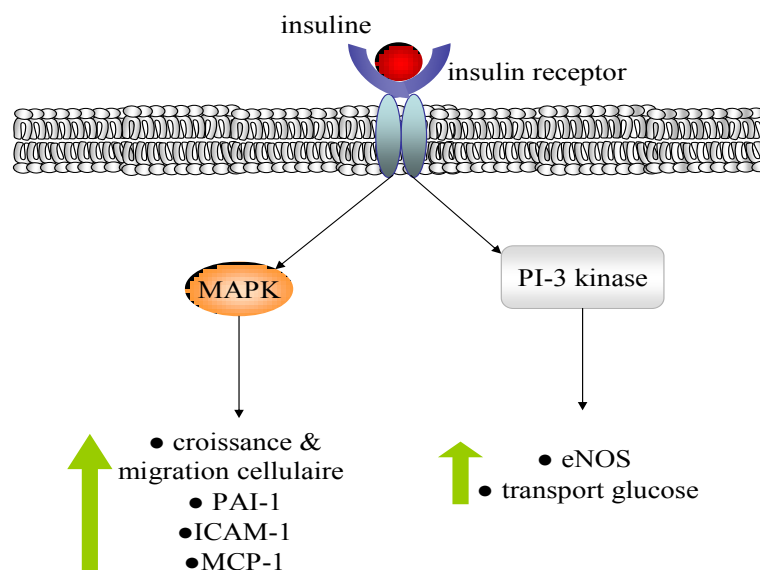


Figure 15. Stimulation des voies PI3-K et MAPK par l'insuline dans les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux sanguins
 (eNOS, endothelial nitric-oxide synthase; ICAM-1 intra-cellular adhesion molecule-1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase)

Comme l'indique la figure 15, la voie MAPK stimule la croissance et la migration cellulaire des monocytes, des cellules vasculaires musculaires lisses (Hsueh et al., 2003). De plus, elle stimule l'expression de facteurs pro-thrombotiques, pro-fibrotiques tel que le plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), un marqueur de risque aigu de maladies cardiovasculaires (Ginsberg, 2000).

II.1.2.5 Dyslipidémie

Dans le syndrome d'insulinorésistance, la dyslipidémie représente une complication majeure, caractérisée par un profil lipidique athérogène (figure 16) : hypertriglycéridémie liée à une surproduction de VLDL, LDL petites et denses, ainsi qu'un faible taux de HDL-C au niveau plasmatique (Taskinen, 1995).

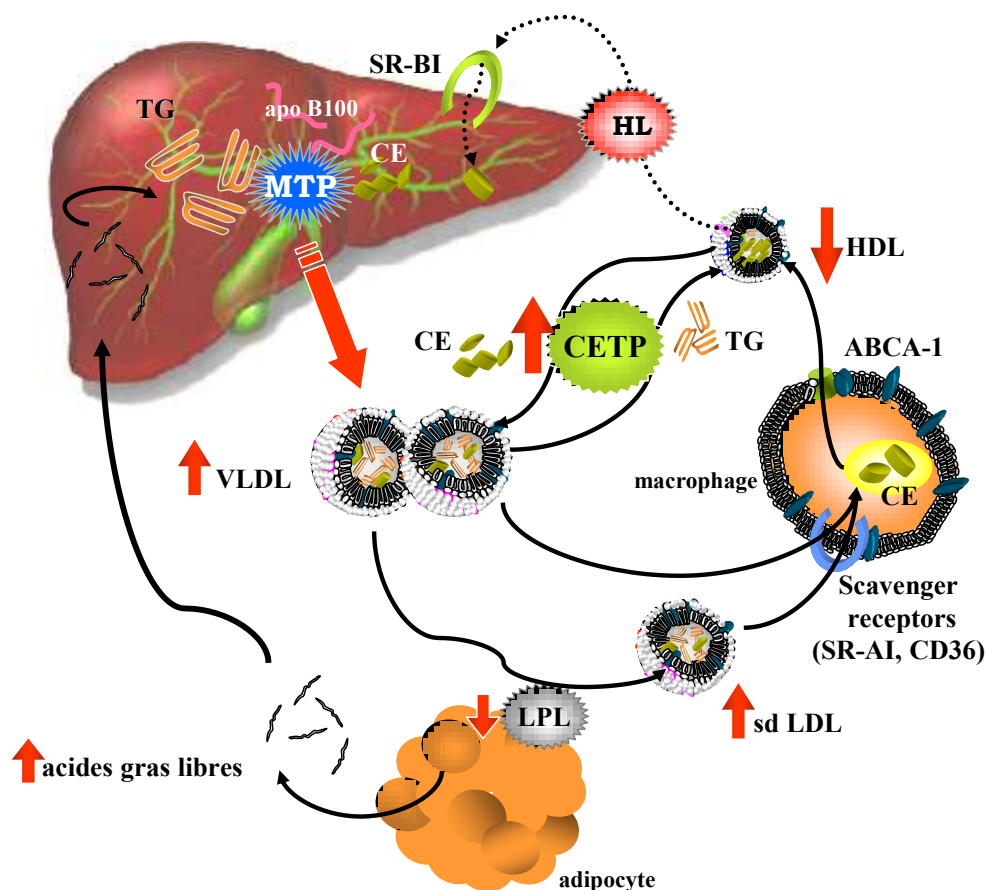


Figure 16. Effets de l'insulinorésistance sur le métabolisme des lipoprotéines (CE, cholesteryl esters; sd LDL, small dense low density lipoprotein)

L'incapacité des adipocytes à stocker les triglycérides serait la première étape dans le développement de la dyslipidémie (Ginsberg, 2000). Selon l'hypothèse portale, la stimulation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux se traduit par une augmentation du flux d'acides gras libres vers le foie, ce qui contribue directement à l'insulinorésistance hépatique (Frayn, 2000). Comme le montre la figure 17, l'altération de l'activité PI3-K par la tyrosine phosphatase PTP-1B (protein tyrosine phosphatase-1B) inhiberait les effets répressifs de l'insuline sur la production hépatique des VLDL (pour revue, Adeli et al., 2001). Chez le hamster insulinorésistant, il a été montré une suppression importante de la cystéine protéase ER-60 dans le réticulum endoplasmique, impliquée dans la dégradation de l'apolipoprotéine (apo) B100, l'apo B100 étant indispensable à la formation et la stabilité des VLDL (Taghibiglou et al., 2002).

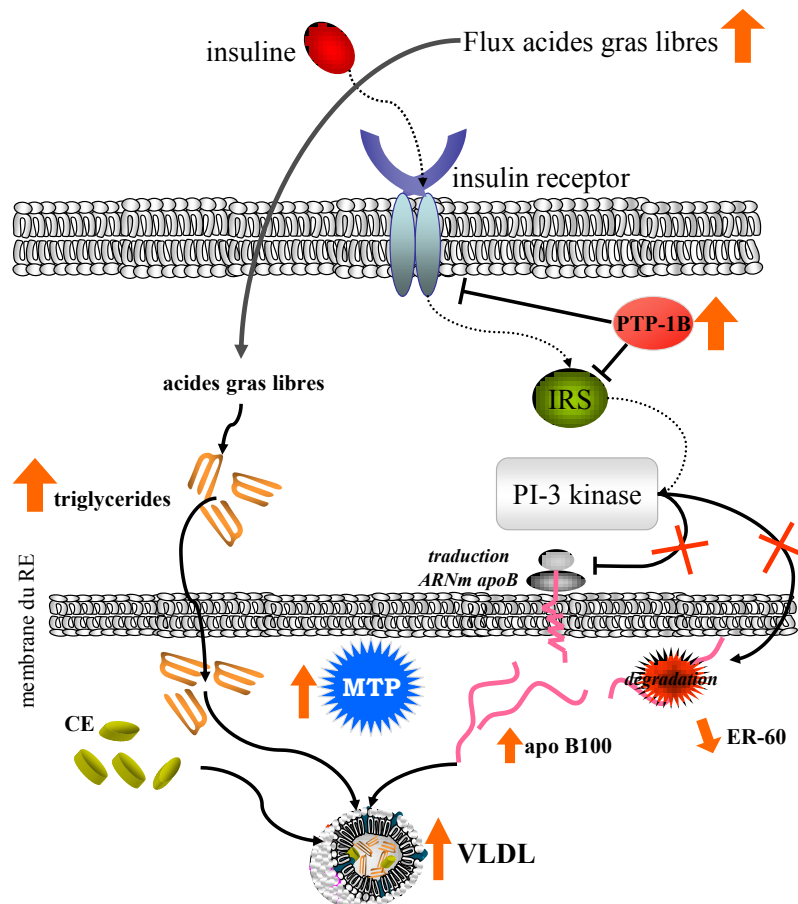


Figure 17. Mécanismes impliqués dans la surproduction hépatique des VLDL-apo B100
(Apo, apolipoprotéine; CE, cholesteryl esters; IRS, insulin receptor substrate, PTP-1B, protein tyrosine phosphatase-1B, RE, réticulum endoplasmique)

La formation des VLDL est dépendante de l'activité de la MTP, qui catalyse le transfert des lipides sur l'apolipoprotéine B100. Le promoteur du gène de la MTP présentant un élément de réponse à l'insuline (Adeli et al. 2001), l'insulinorésistance induit une augmentation de l'expression et de l'activité de la MTP chez le hamster (Qiu et al., 2005). Il a également été montré que les acides gras libres stimulent l'expression de la MTP via un élément de réponse au stérol situé sur le promoteur du gène (Qiu et al., 2005). Enfin, l'augmentation du flux d'acides gras libres stimule la synthèse des triglycérides et favorise donc le transfert des lipides sur l'apo B100 et sa stabilité. Même si les liens entre la voie de signalisation de l'insuline, le flux d'acides gras libres et la production de VLDL-apoB100 ne sont pas totalement connus, l'ensemble de ces mécanismes contribuerait donc à l'hypertriglycéridémie (Adeli et al., 2001).

L'hypertriglycéridémie associée au syndrome d'insulinorésistance serait également liée à une baisse d'activité de la LPL, principalement exprimée dans le tissu adipeux et musculaire (Maheux et al., 1997). La LPL, stimulée par l'insuline, assure l'hydrolyse des triglycérides des VLDL (Preiss-Landl et al., 2002). Ce mécanisme peut être considérée comme mineur face à la surproduction de VLDL (Eckel et al., 2005). Néanmoins, une étude sur des patients insulinorésistants afro-américains a mis en évidence l'importance du rôle de la LPL sur le taux de triglycérides. Chez ces individus en effet, l'insulinorésistance n'a pas d'influence sur l'activité de la LPL, ce qui n'entraîne pas d'hypertriglycéridémie (Sumner et al., 2005). L'augmentation des taux de triglycérides pourrait également être liée à l'apo C-III, apolipoprotéine associée aux VLDL et connue pour diminuer l'activité de la LPL (Florez et al., 2005). Le promoteur du gène de l'apo C-III possède en effet un élément de réponse à l'insuline, qui réprime normalement son expression (Dallinga-Thie et al., 2001).

L'accumulation de VLDL conduit à l'enrichissement en triglycérides des LDL, via un processus d'échange d'esters de cholestérol et de triglycérides facilité par la CETP. L'hydrolyse des LDL enrichis en triglycérides par la HL conduit à la formation de LDL petites et denses (Tan et al., 1995), particules généralement reconnues comme athérogènes. En effet, ces LDL seraient plus sensibles à l'oxydation et s'accumuleraient plus facilement dans les macrophages des parois vasculaires (Bjornheden et al., 1996), notamment grâce à une meilleure affinité pour les récepteurs aux LDL (scavenger receptors tels que SR-AI, CD36) extra-hépatiques (Galeano et al., 1998). Néanmoins, quelques études montrent que des LDL de plus grande taille, enrichies en esters de cholestérol prédisent le risque

cardiovasculaire de façon indépendante (Mykkanen et al, 1999 ; Campos et al., 2001). Le rôle potentiel des LDL petites et denses dans l'athérogenèse mériterait donc d'être précisé.

L'hypertriglycéridémie provoque également une diminution du HDL-cholestérol. Comme pour les LDL, l'augmentation de l'activité CETP contribue à enrichir les HDL en triglycérides en échange d'esters de cholestérol, rendant ces particules instables et plus facilement hydrolysables par la lipase hépatique (pour revue, Rashid et al., 2003). Ce mécanisme augmente considérablement le risque cardiovasculaire : à la surproduction des VLDL et leur catabolisme diminué s'ajoute un enrichissement en cholestérol de ces particules. Les études concernant les plaques d'athérome chez l'homme indiquent en effet une accumulation de particules à apo B100, de densité VLDL et IDL (Rapp et al., 1994). Les TRL les plus denses, incluant les chylomicrons remnants, semblent les particules les plus athérogènes. Potentiellement, les VLDL délivreraient 5 fois plus de cholestérol aux macrophages que ne le font les LDL (Ooi et al, 1998). Cette accumulation de lipides dans la paroi vasculaire s'amplifie du fait de la baisse du HDL-C. En effet, les HDL assurant normalement le retour du cholestérol vers le foie via le scavenger receptor class B type I (SR-BI) pour son excrétion dans la bile (Ji et al., 1999), la baisse de concentration du HDL-C ne fait qu'amplifier le processus d'athérosclérose.

II.2 Effets de l'insulino-résistance sur l'absorption intestinale du cholestérol

II.2.1 Insulino-résistance et absorption du cholestérol

Des études cliniques sur l'homme sain montrent que les taux plasmatiques de LDL-cholestérol et cholestérol total sont positivement associés à l'absorption intestinale du cholestérol mais négativement à sa synthèse (Kesaniemi et al., 1987; Gylling et al., 1989). En d'autres termes, plus l'absorption du cholestérol est importante, plus sa synthèse endogène est moindre et inversement.

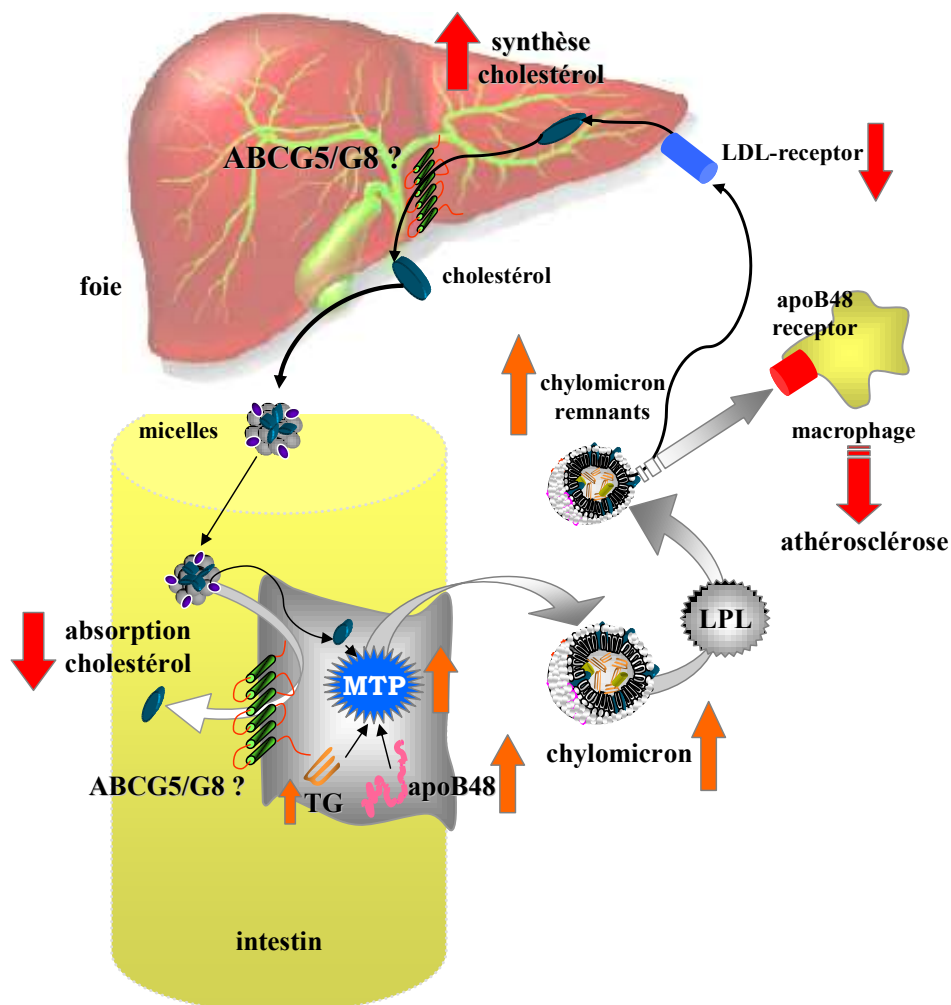


Figure 18. Effets de l'insulino-résistance sur l'absorption intestinale du cholestérol et le métabolisme des chylomicrons

Cette étroite régulation entre synthèse et absorption a été étudiée en mesurant des précurseurs impliqués dans la synthèse du cholestérol (cholesténol, desmostérol, lathostérol) et des marqueurs de l'absorption tels que le campestérol et le sitostérol (Pihlajamäki et al., 2004). Même si les mécanismes régulant cette balance ne sont pas élucidés, la synthèse et l'absorption du cholestérol seraient déterminés par des facteurs génétiques (Gylling et al., 2002) et régulés par l'insuline (Gylling et al., 2004). Chez l'homme, il apparaît clairement que l'insulino-résistance est associée à une moindre absorption du cholestérol et à une synthèse augmentée (Pihlajamäki et al., 2004; Gylling et al., 2004), sans que l'on sache réellement lequel de ces deux paramètres est affecté en premier par l'insulino-résistance (figure 18). En outre, ce déséquilibre est exacerbé en situation de diabète de type II (Simonen et al., 2002).

Une étude réalisée sur des patients normoglycémiques suggère que l'insulino-résistance affecterait prioritairement la synthèse du cholestérol. En effet, les marqueurs de synthèse sont plus fortement corrélés avec l'insulinémie à jeun que les marqueurs d'absorption du cholestérol (Pihlajamäki et al., 2004). Cette association suggère une action directe de l'insuline sur la synthèse de cholestérol. Sur des hépatocytes de rat mis en culture, l'insuline stimule de façon dose-dépendante l'expression hépatique du récepteur nucléaire LXR α (Tobin et al., 2002). Le LXR est connu pour activer la lipogenèse et la biosynthèse du cholestérol (Tobin et al., 2002) via les facteurs de transcription sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) (Horton et al., 2002).

Néanmoins, il n'a pas été encore montré que ces effets de l'insuline sur l'expression de LXR soient maintenus en situation d'insulino-résistance hépatique, où la voie de signalisation de l'insuline est altérée. Sur les mêmes hépatocytes de rat, les acides gras inhibent la liaison de l'insuline à son récepteur, sa dégradation et ses effets biologiques (Svedberg J et al., 1990). L'augmentation du flux d'acides gras libres du tissu adipeux vers le foie stimule la lipogenèse et la sécrétion hépatique des TRL (Ginsberg, 2000). Néanmoins, l'influence possible des acides gras libres sur la biosynthèse du cholestérol n'est pour l'instant pas établie. En effet, les modèles de souris insulino-résistantes montrent une diminution de l'expression d'IRS-2 et une augmentation de SREBP-1c, impliqué dans la lipogenèse (Shimomura et al., 2000). Mais aucun changement n'a été observé au niveau de l'expression de SREBP-2, connu pour activer la synthèse du cholestérol (Horton et al., 1998). Les mécanismes moléculaires stimulant la synthèse du cholestérol lors de l'insulino-résistance restent donc à ce jour inconnus.

Cependant, un déséquilibre entre synthèse de cholestérol et catabolisme hépatique est envisageable. En effet, une baisse de l'expression protéique de la cholestérol 7 α -hydroxylase, impliquée dans le catabolisme du cholestérol, a été observée au niveau hépatique, chez le rat insulino-résistant (Roberts et al., 2004). En revanche, l'expression et l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase n'est pas affectée. Ceci entraîne une augmentation significative de la concentration hépatique en cholestérol, à laquelle s'ajoute une augmentation de l'activité ACAT2 et une baisse d'expression du LDL-receptor. Ces dérèglements contribuent à l'hypercholestérolémie caractéristique de ce modèle animal. Malheureusement, aucune donnée sur l'absorption intestinale n'est disponible dans cette étude (Roberts et al., 2004).

Chez des sujets obèses présentant un pourcentage d'absorption diminué, l'élévation de la synthèse du cholestérol s'accompagne d'une augmentation de son excrétion biliaire (Miettinen et al., 2000). Dans ces conditions, le cholestérol biliaire, en quantité plus importante, entrerait en compétition avec le cholestérol alimentaire pour l'incorporation dans les micelles, ce qui provoquerait une moindre absorption du cholestérol. Chez la souris SR-BI transgénique, une forte corrélation inverse entre taux de cholestérol biliaire et pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol a également été observée (Sehayek et al., 1998). Au niveau de l'entérocyte, il faut également noter un rôle possible des récepteurs ABCG5/G8 dans la réduction de l'absorption intestinale. L'expression de ces récepteurs est en effet stimulée par le cholestérol alimentaire (Repa et al., 2002), diminuant ainsi son absorption (Yu et al., 2002). Même si elle demande à être montrée, une augmentation de l'expression hépatique et intestinale des récepteurs ABCG5/G8 dans le syndrome d'insulino-résistance est également envisageable pour expliquer la baisse d'absorption intestinale du cholestérol.

II.2.2 Insulino-résistance et lipoprotéines intestinales

Plusieurs études sur les modèles animaux et l'homme montrent une augmentation de la production des lipoprotéines intestinale dans le syndrome d'insulino-résistance et le diabète de type II. Bien que l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie aient été attribuées à la surproduction hépatique de VLDL, la contribution des lipoprotéines intestinales devient désormais évidente.

Chez le hamster doré, rendu insulino-résistant par un régime riche en fructose, une augmentation significative de la synthèse et de la sécrétion de lipides, d'apo B48 et de chylomicrons par l'entérocyte a été montrée (Haidari et al., 2002). Dans cette même étude, l'expression de la MTP est augmentée et l'inhibition de son activité produit une baisse de la sécrétion de l'apo B48 par les entérocytes. D'autres études ont démontré une augmentation de l'activité MTP (Lewis et al., 2005) et une stimulation de la sécrétion intestinale de lipoprotéines à apo B48 par les acides gras libres (Lewis et al., 2004) sur le même modèle animal. En résumé, l'insulino-résistance chez le hamster est associée à une surproduction d'apo B48 associée aux chylomicrons. Celle-ci s'explique par une lipogenèse entérocytaire augmentée, permettant une meilleure stabilité intracellulaire de l'apoB48. L'augmentation de l'activité de la MTP amplifierait ces mécanismes d'hypersécrétion des lipoprotéines intestinales (figure 18).

En revanche, sur un autre modèle animal d'insulino-résistance, le rat des sables *Psammomys obesus*, aucun changement dans l'expression et l'activité intestinale de la MTP n'a été montrée malgré une augmentation de la sécrétion des lipoprotéines à apoB48 (Zoltowska et al., 2003). Encore plus contradictoire, une diminution de l'activité MTP est rapportée chez le rat OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) alors que ce modèle se caractérise par une hypertriglycéridémie lymphatique (Hayashi et al., 2002). Il est bien établi qu'avec l'insulino-résistance, la surproduction des lipoprotéines hépatiques est en partie liée à l'augmentation de l'expression et de l'activité de la MTP dans le foie. A l'heure actuelle cette relation n'est pas clarifiée au niveau intestinal. De plus amples données sur la régulation de l'expression de la MTP sont donc nécessaires pour établir un lien avec la surproduction des lipoprotéines intestinales observée sur ces modèles animaux. Il a néanmoins été montré que le promoteur de la MTP chez l'homme et le hamster possédait un élément de réponse positive

au cholestérol et négative à l'insuline (Hagan et al., 1994), ce qui suggère que l'insulino-résistance au niveau intestinal se traduirait par une augmentation de l'expression de la MTP. Une étude récente réalisée chez des patients diabétiques de type II conforte cette hypothèse. Chez ces patients où les taux de TRL associées à l'apo B48 sont élevés (Curtin et al., 1994), l'expression intestinale de la MTP est significativement plus importante que celle de sujets contrôles (Phillips et al., 2005). Inversement, l'effet hypolipémiant d'un traitement à base de statines, se traduit par une baisse de l'expression intestinale de la MTP (Phillips et al., 2005).

Les effets de l'insulino-résistance sur la re-sécrétion du cholestérol alimentaire dans les chylomicrons ne sont pas connus. Cependant, le taux de cholestérol dans les chylomicrons (Annuzzi et al., 2004) et chylomicron remnants (CR) (Saito et al., 2002) augmenterait avec le syndrome métabolique. Il a été montré en outre que des patients obèses hypertriglycéridémiques présentaient des taux de TRL associées à l'apoB48 supérieurs à ceux des patients normotriglycéridémiques, tant à jeun qu'à l'état postprandial (Mekki et al., 1999). Ces désordres métaboliques sont d'ailleurs corrélés aux concentrations plasmatiques d'insuline et d'apo C-III (Mekki et al., 1999). En plus de son rôle inhibiteur sur la LPL (Wang et al., 1985), l'apo C-III contribuerait également à diminuer le catabolisme des chylomicrons remnants (deSilva et al., 1994) via leurs récepteurs hépatiques. La baisse de catabolisme de ces particules a en effet été rapportée chez les sujets obèses insulino-résistants (Chan et al., 2002) et s'expliquerait par une compétition entre CR et VLDL d'origine hépatique pour la liaison aux LDL-R et LRP (pour revue Martins et al., 2004). Une teneur réduite en apo E dans les CR explique aussi une moindre liaison aux récepteurs (deSilva et al., 1994; Owens, 2003). Chez l'homme, les patients porteurs du génotype apo E2 présentent des taux élevés de CR-cholestérol, du fait d'une moindre liaison de l'apo E2 avec le LDL-R (Saito et al., 2002). Par ailleurs, les taux de CR-cholestérol augmentent d'autant plus lorsque ces patients sont diabétiques de type II (Saito et al., 2002). Associée à une surproduction intestinale, l'altération du catabolisme de ces lipoprotéines favorise donc l'accumulation de particules athérogènes.

Au niveau cardiovasculaire, les lipoprotéines à apoB48 auraient en effet un pouvoir pro-athérogène équivalent à celui des lipoprotéines à apo B100. Le risque cardiovasculaire augmente sensiblement avec les concentrations en apo B48 (pour revue, Proctor et al., 2002), d'autant plus que les taux de cholestérol associé aux remnants de chylomicrons sont élevés

dans le syndrome métabolique (Sato et al., 2005). En outre, la rétention du cholestérol des chylomicrons remnants contenant l'apo B48 est de 4 à 5 fois supérieure à celle provoquée par les LDL- apo B100 au niveau des parois vasculaires (Fielding, 1992; Ooi et al., 1998; Proctor et al., 2002).

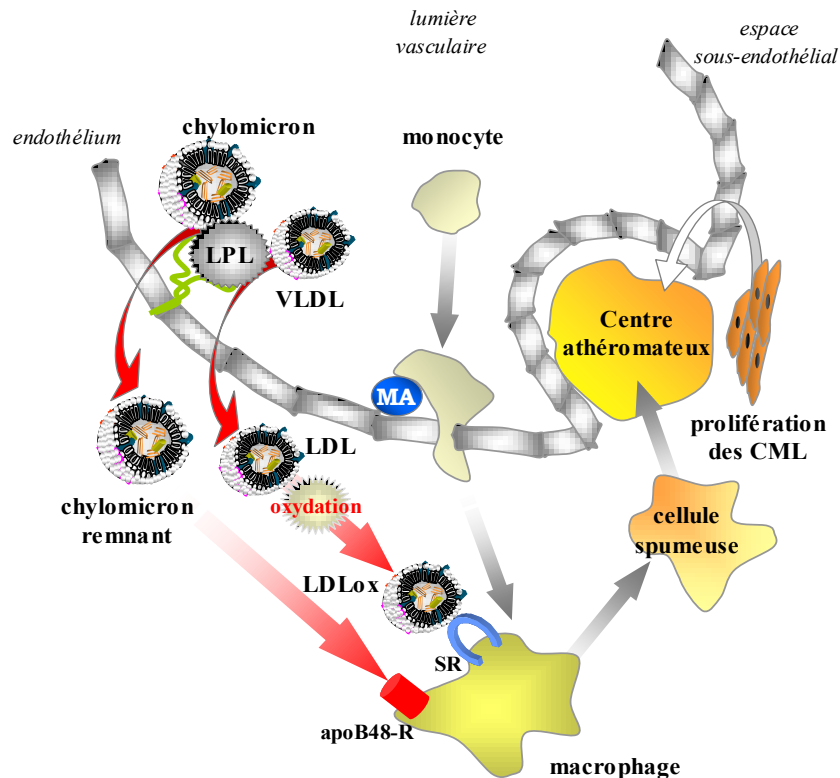


Figure 19. Formation de la plaque athéromateuse
(CML, cellules musculaires lisses; MA, molécule d'adhésion;
LDLox, LDL oxydées; SR, scavenger receptors)

Bien que l'oxydation des LDL représente un mécanisme majeur dans le processus athérosclérotique, la contribution des lipoprotéines intestinales (figure 19) n'est donc pas négligeable. La mise en évidence du récepteur à l'apo B48 au niveau des macrophages (Brown et al., 2000) appuie d'autant plus l'idée d'un caractère athérogène de ces lipoprotéines (figure 19), sachant que l'homme vit la majorité du temps dans un état postprandial.

II.3 Effets de l'insulino-résistance sur le transport inverse du cholestérol

II.3.1 Insulino-résistance et formation des pré-β-HDL

La diminution du HDL-cholestérol dans le syndrome métabolique a dirigé de nombreuses études sur d'éventuelles perturbations des mécanismes d'efflux du cholestérol et de formation des pré-β-HDL. Les données concernant l'efflux de cholestérol montrent des résultats contradictoires. La mise en culture de cellules Fu5AH et J774, en présence de sérum issu de patients hypertriglycéridémiques à faible taux de HDL-cholestérol, montrent une baisse importante de l'efflux de cholestérol (Brites et al., 2000). Les études sur une hypothétique baisse de l'efflux du cholestérol sont peu développées. Cependant, Wang et al. ont pu établir un effet important des acides gras libres insaturés sur la déstabilisation et la baisse d'expression d'ABCA1 *in vitro* (Wang et al., 2005). A l'opposé, en comparant la mise en culture de fibroblastes de patients atteints du syndrome métabolique et de patients atteints par la maladie de Tangier, Alenezi et al., ont montré qu'il n'y avait aucune altération de l'efflux de cholestérol chez les patients présentant un faible taux de HDL-cholestérol (Alenezi et al., 2005).

En fait, il est probable que dans le syndrome d'insulino-résistance, la baisse du HDL-cholestérol ne soit pas liée à une altération de la production des particules HDL (figure 20). Si l'on s'intéresse aux études cinétiques décrivant le métabolisme de l'apo A-I, on peut en effet constater que la production d'apo A-I n'est pas affectée (Frénais et al., 2001; Pont et al., 2002), voire même augmentée (Batista et al., 2004) chez les patients insulino-résistants. Comme on le verra plus loin, la diminution des taux d'apo A-I semble plutôt liée à l'hyper-catabolisme de l'apo A-I observé dans les états hypertriglycéridémiques.

II.3.2 Insulinorésistance, enzymes de transfert et lipases

L'insulinorésistance a des conséquences sensibles sur les enzymes de transfert et les lipases. Néanmoins, on distingue à l'heure actuelle un rôle clé de la CETP et de la HL dans l'association entre hypertriglycéridémie et faible taux de HDL-cholestérol.

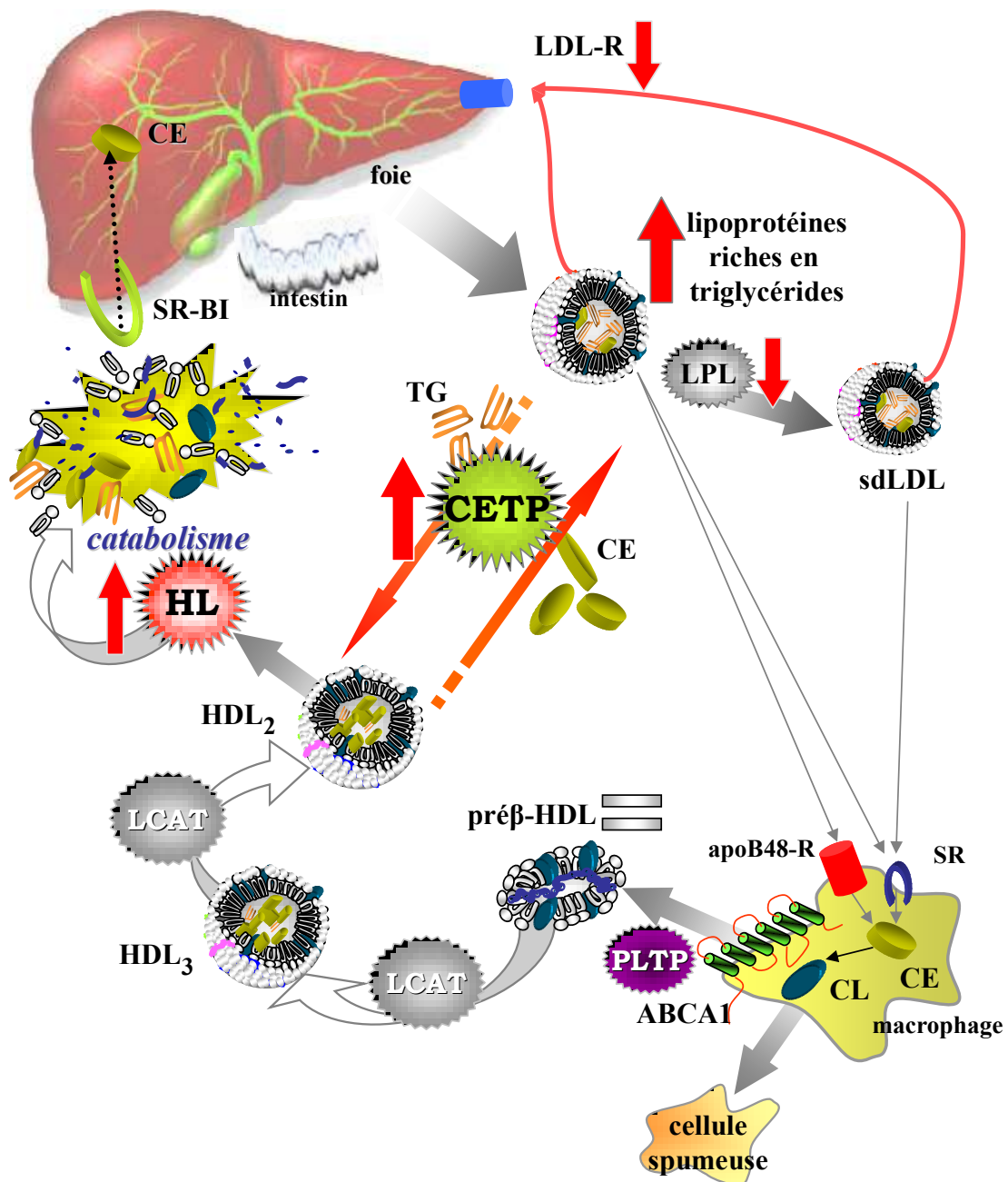


Figure 20. Effets de l'insulinorésistance sur le transport inverse du cholestérol chez l'homme

LCAT

Les perturbations de l'activité LCAT dans le syndrome d'insulino-résistance sont peu rapportées, même si une tendance à l'augmentation se dessine chez les sujets hypertriglycéridémiques. Sur des études cellulaires sur l'efflux de cholestérol, Brites et al. ont rapporté une activité augmentée mais non significative de l'activité LCAT (Brites et al., 2000). Sur une cohorte de 137 sujets hypertriglycéridémiques, Tato et al. ont rapporté une activité LCAT supérieure de 7% comparée à celle des sujets contrôles (Tato et al., 1997). Murakami et al., ont également mesuré des taux d'estérification plasmatique supérieure chez des sujets hypertriglycéridémiques. Néanmoins, la part des triglycérides apparaît plus importante dans la modulation des taux de HDL-cholestérol que la concentration en LCAT (Murakami et al., 1995; Borggreve et al., 2003).

PLTP

Des études récentes suggèrent une augmentation de l'activité PLTP avec l'insulino-résistance. Chez des sujets obèses et/ou diabétiques de type II, Riemens et al., ont observé des activités PLTP supérieures à celles de sujets contrôles, corrélées avec l'insulino-résistance ainsi qu'avec les taux d'acides gras libres et de triglycérides (Riemens et al., 1998). Cet effet de l'insulino-résistance sur l'activité PLTP a été plus récemment confirmée (Jonkers et al., 2003). Au niveau du transport inverse du cholestérol, la plus forte activité PLTP participerait à l'efflux de cholestérol chez les sujets insulino-résistants, augmentant ainsi la formation des préβ-HDL. Ceci expliquerait l'absence d'altération de l'efflux de cholestérol chez les sujets insulino-résistants (Dullaart et al. 2001), la PLTP jouant un rôle de stabilisation d'ABCA1 (Oram et al., 2003).

CETP

Avec la HL, la CETP semble être au centre de l'association hypertriglycéridémie-faible taux de HDL-cholestérol rencontrée dans le syndrome métabolique. La CETP contribue à l'enrichissement en triglycérides des HDL qui s'amplifie avec la surproduction de TRL. En effet, la masse de lipides transférés par la CETP dépend directement du pool de TRL (Foger

et al., 1996). L'augmentation de l'activité CETP dans l'état d'hypertriglycéridémie a deux effets néfastes : d'une part le transfert des esters de cholestérol dans les TRL qui sont ensuite captés dans les parois vasculaires (Borggreve et al., 2003), d'autre part un enrichissement en triglycérides des HDL, rendant la particule instable et plus facilement hydrolysable par la lipase hépatique (Rashid et al., 2003). Les effets de l'enrichissement en triglycérides sur le catabolisme de l'apo A-I des HDL ont été clairement montrés chez l'homme sain (Lamarche et al., 1999). Bien que ce mécanisme contribue pleinement à l'augmentation du catabolisme des HDL et à la baisse conséquente des taux d'apo A-I, l'enrichissement en triglycérides *per se* ne serait pas directement impliqué dans ce catabolisme. En effet, chez le lapin, naturellement déficient en lipase hépatique, l'enrichissement en triglycérides des HDL ne suffit pas à augmenter leur catabolisme (Rashid et al., 2001). En revanche, l'expression de la lipase hépatique humaine chez le lapin augmente significativement le catabolisme des HDL enrichies en triglycérides (Rashid et al., 2003).

HL

Comme évoqué plus haut, l'implication de la HL est prédominante dans le catabolisme des HDL associé à l'hypertriglycéridémie. En effet, en situation d'insulino-résistance, l'activité de la HL est augmentée. Dans des conditions où les échanges de lipides entre HDL et TRL sont favorisés par la CETP, l'activité de la HL est corrélée avec les faibles taux de HDL (Després et al., 1989). Bien que la régulation de la HL par l'insuline ne soit pas aussi évidente que pour la LPL, les études sur modèles animaux indiquent un rôle de l'insulino-résistance hépatique. En effet, chez le hamster, l'insulino-résistance s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'ARNm, de la protéine et de l'activité HL. Le traitement par la rosiglitazone, reconnue pour augmenter la sensibilité à l'insuline, inverse cette tendance (Lewis et al., 2004). L'activité augmentée de la HL contribue donc au catabolisme des HDL enrichis en triglycérides (mais pas aux particules non enrichies), formant une particule plus instable et plus facilement catabolisée, notamment au niveau du rein. Plus précisément, l'action de la HL résulte en la formation de α HDL₂ remnants, différents des HDL₃ et caractérisés par des taux réduits de triglycérides et de phospholipides avec un changement conformationnel de l'apo A-I (Lewis et al., 1997). La liaison des α HDL₂ remnants à leurs récepteurs serait alors augmentée, favorisant ainsi leur catabolisme.

LPL

L'activité de la LPL étant régulée par l'insuline, son activité est réduite dans le syndrome d'insulino-résistance. Cette baisse d'activité réduirait indirectement la production de HDL du fait d'une baisse de l'hydrolyse des TRL, source de lipides et d'apolipoprotéines dans la formation et la maturation des HDL (Preiss-Landl et al., 2002; Rashid et al., 2003). Néanmoins, dans les états hypertriglycéridémiques, les études cinétiques de l'apo A-I indiquent une augmentation du catabolisme de l'apo A-I alors que l'augmentation de la production, même si elle a été rapportée (Batista et al., 2004) n'est pas toujours significative (Frénais et al., 2001; Pont et al., 2002). L'effet d'une baisse d'activité de la LPL sur la production et le taux de HDL demande donc à être confirmé.

EL

Les effets de l'insulino-résistance sur l'EL, découverte récemment, ne sont pas encore détaillés. Néanmoins, le syndrome métabolique étant également caractérisé par un état inflammatoire, son activité pourrait être augmentée. Les cytokines ont démontré un effet activateur sur cette lipase (Broedl et al., 2004).

II.3.3 Insulino-résistance, récepteurs et capture sélective du HDL-cholestérol

Bien que le catabolisme des HDL soit augmenté, les données sur les récepteurs des HDL en situation d'insulino-résistance sont peu développées. Cette absence de données vient du fait qu'il est difficile d'étudier l'expression hépatique des récepteurs chez l'homme pour des raisons éthiques. Certaines études ont tenté d'utiliser les monocytes pour étudier leur expression en prenant le risque de postuler qu'elle serait corrélée à l'expression hépatique. C'est le cas du LDL-receptor (Mamo et al., 2001) mais cette extrapolation semble peu fiable car elle est le fruit de résultats contradictoires (Vega-Lopez et al., 2003).

Néanmoins, Nakagawa-Toyama et al. ont étudié l'expression du récepteur SR-BI au niveau du foie et des artères humaines. Même si la régulation hépatique de SR-BI chez l'homme n'est pour l'instant pas connue, il apparaît que SR-BI est largement exprimé dans les plaques d'athérome (Nakagawa-Toyama et al., 2005). Du fait que le récepteur SR-BI influence potentiellement les taux de HDL-cholestérol chez l'homme (Hsu et al., 2003) et la souris (Zhang et al., 2005), il serait donc intéressant de connaître son expression hépatique pour évaluer les effets de l'insulino-résistance sur le TIC. Dans cette démarche, des études sur la capture sélective du cholestérol des HDL seront nécessaires, sachant qu'elles ont déjà été menées chez l'homme (Ouguerram et al., 2002) et le chien sain (Ouguerram et al., 2004). Concernant les données disponibles sur les modèles animaux, une baisse de l'expression hépatique du SR-BI (et du LDL-receptor) a été montrée chez la souris ob/ob (Lundasen et al., 2003). En revanche, le rat insulino-résistant montre une expression du SR-BI augmentée au niveau hépatique (Roberts et al., 2004).

II.4 Le chien modèle animal de l'insulino-résistance

Le chien en tant que modèle animal de l'insulino-résistance a été récemment utilisé pour des études portant sur l'hypertension (Rocchini et al., 2004), l'intolérance au glucose (Kaiyala et al., 1999) et la théorie portale (Kabir et al., 2005). Dans cette dernière étude, Kabir et al. ont mis en évidence les dérèglements métaboliques induits par un régime modérément enrichi en lipides au niveau du tissu adipeux viscéral, avec pour conséquence une insulino-résistance et une lipogenèse activée au niveau hépatique. Dans la plupart des études, l'insulino-résistance est facilement établie par des régimes enrichis en lipides sur 6 à 12 semaines (Kaiyala et al., 1999; Rocchini et al., 2004; Kabir et al., 2005). D'autre part, l'insulino-résistance peut être associée à une hyperglycémie par l'administration d'alloxan chez le chien (Niwa et al., 2000). Il faut cependant noter que l'apparition du diabète de type II n'est pas une caractéristique de l'espèce canine (Catchpole et al., 2005).

Les données concernant le métabolisme des lipoprotéines chez le chien insulino-résistant sont limitées. Néanmoins, nous avons pu étudier l'évolution du profil lipoprotéique chez le chien avec l'apparition de l'insulino-résistance (Bailhache et al., 2003). Dans cette étude, les chiens soumis à un régime hyperénergétique développent une insulino-résistance associée à une augmentation significative des taux de triglycérides plasmatiques, plus précisément dans les fractions VLDL et HDL. En outre, une augmentation des taux d'acides gras libres et une baisse du HDL-cholestérol indiquent que le chien présenterait des désordres métaboliques proches de ceux rencontrés chez l'homme insulino-résistant (Bailhache et al., 2003). En effet, le chien obèse insulino-résistant présente également des taux augmentés de TNF α , d'IGF-1 (Gayet et al., 2004) et une baisse d'expression de PPAR γ au niveau du tissu viscéral (Leray et al., 2004).

III. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES DES DYSLIPIDEMIES ASSOCIEES A L'INSULINORESISTANCE

III.1 Les traitements actuels

III.1.1 Les inhibiteurs de l'HMG-CoA reductase (statines)

En inhibant l'HMG-CoA reductase, enzyme indispensable à la synthèse du cholestérol, les statines réduisent les taux de cholestérol intra-hépatique et stimulent l'expression du LDL-receptor. En conséquence, les taux de LDL-cholestérol diminuent. La diminution de la production hépatique des TRL par les statines, suite à une moindre biodisponibilité du cholestérol, se traduit par une baisse des triglycérides (pour revue, Vaughan et al., 2003). Une augmentation modérée du HDL-cholestérol, variable suivant les statines actuellement disponibles, est également observée (voir tableau 5). Cependant, une baisse du HDL-cholestérol spécifique à l'atorvastatine a été rapportée à la dose maximale de 80mg (Wierzbicki et al., 1999). Hormis leur pouvoir hypolipémiant, les statines présentent des effets dits pléiotropiques en favorisant la stabilité des plaques d'athérome via l'activation des macrophages et une action anti-thrombotique (Sukhova et al., 2002).

Drogues	Diminution du cholestérol (%)	Diminution du LDL- cholestérol (%)	Augmentation du HDL- cholestérol (%)	Diminution des triglycérides (%)	Demi - vie(t½) en heures
Atorvastatine	25-45	26-60	5-13	17-53	13-30
Fluvastatine	16-27	22-36	3-11	12-25	0.5-3.0
Lovastatine	16-34	21-42	2-10	6-27	2-4
Pravastatine	16-25	22-34	2-12	15-24	2-3
Rosuvastatine	33-46	45-63	8-14	10-35	19
Simvastatine	19-36	26-47	8-16	12-34	1-3

Tableau 5. Comparaison de l'effet hypolipémiant et de la pharmacologie des six statines disponibles en 2003 (d'après Vaughan et al., 2003).

Les statines, en diminuant les taux de cholestérol favorisent la liaison du facteur de transcription SREBP-2 sur le promoteur du gène du LDL-receptor (figure 21), stimulant ainsi l'expression de son ARNm (Luc, 2000). Néanmoins, ce mécanisme ne se traduirait pas forcément par une plus forte expression membranaire mais par un recyclage accéléré du LDL-receptor. La puissance d'une statine reposerait donc sur sa capacité à accélérer le recyclage du LDL-receptor hépatique (Ness et al., 1998) mais aussi sur son affinité de liaison à l'HMG-CoA (Ness et al., 1998).

L'augmentation modérée des taux de HDL-cholestérol par les statines s'explique par leur action inhibitrice de la voie de signalisation Rho-dépendante. Cet effet aboutit à une activation de PPAR α qui induit l'expression du gène de l'apo A-I (Martin et al., 2001). Ainsi les statines stimuleraient la production d'apo A-I, ce qui expliquerait les effets bénéfiques sur les taux de HDL-cholestérol. A l'opposé, les mécanismes impliqués dans la baisse du HDL-cholestérol lors d'un traitement à forte dose d'atorvastatine (80mg) ne sont pas connus. Une seule étude chez le lapin traité à 5mg/kg/jour met en évidence un catabolisme élevé de l'apo A-I des HDL, non compensé par l'augmentation de la production, aboutissant à une diminution significative des taux d'apo A-I (Rashid et al., 2002).

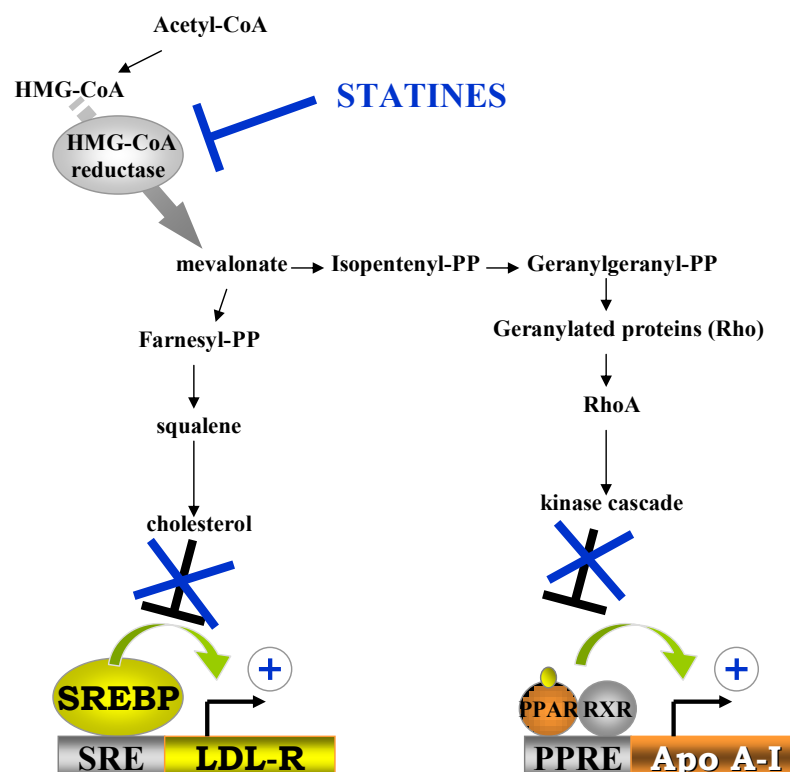


Figure 21. Mécanismes d'action des statines

III.1.2 Les agonistes PPAR α (fibrates)

Les fibrates étant des agonistes du facteur de transcription PPAR α , leurs effets se traduisent par une baisse des taux de TRL et une baisse modérée de LDL-cholestérol et par une augmentation des taux de HDL-cholestérol, d'apo A-I et d'apo A-II (pour revue, Staels et al., 1998).

L'activation de la LPL et la réduction de l'expression hépatique d'apo C-III par les fibrates sont les deux mécanismes majeurs provoquant la baisse des taux de triglycérides (Barbier et al., 2002). Il a également été montré chez le rat une baisse de la production des TRL (Staels et al., 1998) suite à un catabolisme hépatique des acides gras augmenté (Maragandakis et al., 1971). Néanmoins, les études cinétiques chez l'homme ne montrent pas d'effet des fibrates sur la production mais bien sur le catabolisme des lipoprotéines à apoB chez l'homme (Watts et al., 2003).

Outre leurs effets hypolipémiants, les fibrates ont démontré une action anti-athérogène en stimulant l'expression du SR-BI et d'ABCA1 dans les macrophages (Fruchart et al., 2001). Les fibrates préviennent également l'inflammation, la rupture de plaque et la thrombogenèse (Barbier et al., 2002).

III.1.3 Les agonistes PPAR γ (thiazolidinediones)

Du fait de leur pouvoir insulino-sensibilisateur et hypoglycémiant, les thiazolidinediones (rosiglitazone, pioglitazone) sont utilisés dans le traitement du diabète de type II.

Les thiazolidinediones activent le PPAR γ , exprimé très majoritairement dans le tissu adipeux, contrairement au muscle, site majeur de capture du glucose. L'activation du PPAR γ par les thiazolidinediones favorise la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (pour revue, Spiegelman, 1998). La capture des acides gras libres par le tissu adipeux est stimulée via l'induction des gènes de la LPL, de la fatty acid transport protein (FABP), de l'acyl-coA synthase. L'utilisation musculaire des acides gras serait alors diminuée, de même que leurs effets inhibiteurs sur l'utilisation musculaire du glucose. En conséquence, la capture musculaire du glucose serait augmentée, ce qui expliquerait l'effet hypoglycémiant des thiazolidinediones (Girard, 2002).

En plus de ces effets sur la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose, les thiazolidinediones améliorent sensiblement le métabolisme lipidique. Comme pour les fibrates, les thiazolidinediones activent l'action de la LPL et diminuent la production d'apo C-III, favorisant ainsi le catabolisme des TRL chez l'homme (Nagashima et al., 2005). Ces effets bénéfiques ont également été observés en état postprandial, avec une diminution significative des taux de triglycérides et d'acides gras libres avec la rosiglitazone (van Wijk et al., 2005). Cette baisse de la triglycémie aurait un effet bénéfique sur les taux de HDL-cholestérol, avec en contrepartie une tendance à augmenter le LDL-cholestérol (Sunayama et al., 2000). Enfin, l'efflux de cholestérol au niveau périphérique serait également augmenté via l'expression du SR-BI et d'ABCA1 dont l'expression est stimulé par PPAR γ (Chinetti et al., 2000; Chawla et al., 2001). Comme pour les fibrates, les thiazolidinediones possèdent des propriétés anti-athérogéniques, récemment démontrées de manière épidémiologique par l'étude PROactive (Dormandy et al., 2005).

III.2 Les traitements émergents

III.2.1 Les inhibiteurs de CETP

La déficience en CETP étant associée à des taux élevés de HDL-cholestérol chez l'homme (Ikewaki et al., 1995), la CETP représente une cible pharmacologique très importante. Deux molécules (JTT-705 et torcetrapib) sont actuellement testées chez l'homme, avec des effets très significatifs sur le HDL-cholestérol, avec des augmentations allant de 16 à 106% suivant les doses et les drogues, sans effet secondaire (van der Steeg et al., 2004). L'inhibition de la CETP par le torcetrapib se traduit également par une baisse des taux de lipoprotéines à apo B, notamment du LDL-C et une augmentation de la taille des HDL et LDL (Brousseau et al., 2004).

Malgré ces résultats très encourageants, l'effet bénéfique sur le transport inverse du cholestérol reste néanmoins à démontrer. Il est nécessaire de savoir si les HDL enrichies en esters de cholestérol représente un bon substrat pour l'efflux et la capture sélective via le SR-BI, sachant que les sujets déficients en CETP ne sont pas protégés face à l'accumulation de cholestérol dans les macrophages (Ishigami et al., 1994). Les effets du torcetrapib sur le

métabolisme de l'apo A-I des HDL ont été récemment étudiés. Chez des sujets à faible taux de cholestérol, le torcetrapib provoque une augmentation des taux plasmatiques d'apo A-I, suite à une diminution significative du catabolisme de l'apo A-I des HDL (Brousseau et al., 2005). En revanche, l'administration d'atorvastatine combinée avec le torcetrapib inhibe cet effet. Dans les deux situations, l'efficacité du transport inverse du cholestérol, estimée grâce à la mesure des stérols fécaux, reste inchangée (Brousseau et al., 2005). Des études à plus long terme seront nécessaires pour démontrer l'efficacité des inhibiteurs de CETP dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

III.2.2 Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol

L'intérêt d'une inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol pour abaisser les taux de cholestérol chez l'homme a été montré par l'ezetimibe. L'efficacité de l'ezetimibe repose sur le fait que sa cible thérapeutique majeure est NPC1L1 (Garcia-Calvo M et al., 2005), identifié comme le récepteur prenant en charge l'absorption intestinale du cholestérol. L'ezetimibe agit donc principalement au niveau des bordures en brosse de l'intestin en empêchant l'absorption du cholestérol alimentaire et biliaire, sans affecter l'absorption des vitamines, des triglycérides et des acides biliaires (pour revue, Al-Shaer et al., 2004).

Après deux semaines de traitement, l'ezetimibe à 10mg/jour abaisse le cholestérol total (12%), le LDL-C (18%), l'apoB (15%), les triglycérides (7%) et augmente le HDL-cholestérol (3,5%) (Dujovne et al., 2003). Ces effets sont amplifiés lorsque l'on combine l'ezetimibe avec un traitement à base de fibrate ou de statine (Al-Shaer et al., 2004). L'effet anti-athérogène de l'ezetimibe reste à démontrer par des études à long terme. Néanmoins, l'ezetimibe diminuerait de 60% le taux de cholestérol dans les chylomicrons, diminuant ainsi le potentiel athérogène des chylomicrons remnants (Evans et al., 2002).

Les stérols et stanols végétaux diminuent également l'absorption intestinale du cholestérol, avec, en conséquence, une baisse significative du LDL-C chez l'homme (Hallikainen et al., 2000). Deux mécanismes d'action ont été évoqués. Comparé au cholestérol, les phytostérols s'incorporeraient plus facilement dans les micelles (Armstrong et al., 1987). Administrés simultanément lors d'un repas, les phytostérols et le cholestérol entreraient ainsi en compétition pour leur incorporation dans les micelles. Néanmoins, l'effet

des stérols végétaux est le même quelque soit la fréquence de consommation quotidienne : 2,5g d'esters de stanols administrés en un seul repas ou répartis sur trois repas réduisent de manière similaire le LDL-C (Plat et al., 2000). Un effet intra-entérocytaire des stérols végétaux est donc plus réaliste. Les stérols et les stanols végétaux activent en effet le LXR dans les cellules Caco-2 (Plat et al., 2005), et agiraient ainsi sur l'expression des récepteurs ABCG5/ABCG8 (Yu et al., 2002) et NPC1L1 (Duval et al., 2006). Cependant, chez le hamster, les esters de stanol diminuent l'absorption intestinale du cholestérol indépendamment de l'expression des récepteurs ABC et NPC1L1 (Field et al., 2004). Enfin, bien que les mécanismes d'action des stérols végétaux et de l'ezetimibe soient potentiellement différents, leur combinaison n'a pas démontré d'effet hypocholestérolémiant supérieur à l'ezetimibe seul (Jakulj et al., 2005).

III.2.3 Les doubles agonistes de PPAR α /PPAR γ

Dans l'optique de cumuler les effets bénéfiques des agonistes de PPAR α et de PPAR γ , des doubles agonistes sont actuellement en développement. Des résultats encourageants ont été obtenus sur les modèles animaux d'obésité et de diabète (Ljung et al., 2002) et des études pré-cliniques montrent des effets hypoglycémiant et hypolipémiant prometteurs (Skrumsager et al., 2003). Néanmoins, le potentiel carcinogène de ces doubles agonistes demande des évaluations plus approfondies pour confirmer ces résultats.

III.3 Conclusion : Intérêt du chien dans les études sur l'insulinorésistance et les traitements pharmacologiques

Lors de cette étude bibliographique, nous avons pu constaté un certain manque de données concernant le modèle canin. Paradoxalement, le chien est un modèle couramment utilisé dans le développement des drogues hypolipémiantes. En effet, cet animal s'adapte remarquablement à l'expérimentation, et du fait de sa taille, permet facilement la réalisation de protocoles tels que les tests de tolérance au glucose (Kaiyala et al., 1999), les clamps euglycémiques hyperinsulinémiques (Matsuhisa et al., 1997), les études cinétiques (Bailhache et al., 2004) et les opérations chirurgicales sans sacrifier l'animal. Grâce à cette adaptabilité aux protocoles expérimentaux, on peut répertorier, de façon non exhaustive, un certain nombre d'études démontrant l'efficacité des statines (Bischoff et al., 1998), des agonistes de PPAR α (Nagasawa et al., 2004), des agonistes de PPAR γ (Matsuhisa et al., 1997), des double-agonistes de PPAR α/γ (Guo et al., 2004) et de l'ezetimibe (Davis et al., 2001).

D'autre part, l'obésité et l'insulinorésistance sont facilement inductibles sur ce modèle animal, permettant là aussi d'évaluer les effets d'une molécule en développement. De plus amples connaissances sur le métabolisme glucidique et lipidique chez le chien sont donc d'un intérêt majeur pour les futures investigations pharmacologiques. Des données concernant les gènes impliqués dans le syndrome d'insulinorésistance commencent d'ailleurs à être développées chez le chien (Nagasawa et al., 2004; Kabir et al., 2005). De plus, le séquençage récent du génome canin représente également une avancée considérable dans l'exploitation du modèle (Lindblad-Toh et al., 2005). Ainsi, des connaissances plus précises sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines, plus particulièrement en situation d'insulinorésistance, favoriseraient le développement optimal des molécules hypolipémiantes.

OBJECTIFS

Objectifs

Actuellement, l'absorption intestinale du cholestérol et le transport inverse du cholestérol représentent deux cibles majeures pour le développement de nouveaux traitements des dyslipidémies associées au syndrome d'insulinorésistance. Le chien étant un modèle animal couramment utilisé dans la mise au point de ces traitements, il nous a paru utile sinon essentiel d'accroître les connaissances sur ces deux processus sur notre modèle de chien obèse insulinorésistant.

Notre premier objectif a été la transposition d'une méthode de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol (méthode de Zilversmit). Pour illustrer la validité de cette méthode, nous avons ensuite évalué les effets de l'atorvastatine (article n°1) et de l'insulinorésistance (article n°2) sur le pourcentage d'absorption du cholestérol.

En outre, la contribution de l'état postprandial dans les maladies cardiovasculaires est loin d'être négligeable. Ainsi, notre deuxième objectif a-t-il été de développer l'intérêt du chien obèse insulinorésistant dans l'étude des dyslipidémies postprandiales (article n°2 et n°3), d'une part en étudiant la re-sécrétion du cholestérol alimentaire dans les chylomicrons (article n°2), d'autre part en montrant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par la rosiglitazone et les effets bénéfiques conséquents sur la lipémie postprandiale (article n°3).

Enfin, l'étude des effets de l'insulinorésistance (article n°4) et des traitements pharmacologiques (article n°5) sur le transport inverse du cholestérol a représenté notre troisième objectif. Notre méthode a été basée sur l'exploration cinétique du métabolisme des HDL grâce à l'utilisation du marquage des isotopes stables et à la modélisation compartimentale.

PARTIE EXPERIMENTALE

IV. MESURE DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL ET EXPLORATION CINETIQUE DU METABOLISME DES HDL

IV.1 Méthodes de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol

Il existe quatre méthodes de mesure (une directe, trois indirectes) qui permettent de calculer un pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol (pour revue, voir Wang et al., 2003). Bien que différentes, elles fournissent des valeurs comparables suivant les espèces (voir tableau 6). Par ailleurs, le dosage des phytostérols plasmatiques comme indicateurs de l'absorption intestinale est une autre alternative pour évaluer l'absorption du cholestérol chez l'homme.

IV.1.1 Mesure du transport lymphatique du cholestérol (mesure directe)

La mesure du transport lymphatique du cholestérol, plus invasive, nécessite l'insertion d'un cathéter dans le canal lymphatique mésentérique de l'individu et d'un autre cathéter dans le duodénum, qui permet l'administration de cholestérol radio-marqué à travers une solution huileuse. La lymphe est alors récupérée pendant plusieurs heures pour y mesurer le cumul de radioactivité, sachant qu'un plateau est atteint au bout de 10-12 heures chez la souris (Wang et al., 2003), le rat (Sylvén et al., 1968), le lapin (Redgrave, 1973), le chien (Melchior et al., 1985) et l'homme (Doi et al., 1987).

Cette méthode est la seule mesure directe de l'absorption intestinale du cholestérol, mais elle nécessite un flux lymphatique continu pour obtenir des résultats cohérents. Ceci peut néanmoins s'obtenir par une perfusion continue d'une solution lipidique ou de NaCl à 0,9% (Wang et al., 2003).

Espèces	Méthode	% absorption cholestérol
Souris	Transport lymphatique	21-33
	Balance	27-39
	Zilversmit	24-37
	Fécale	29-42
Rat	Transport lymphatique	40-45
	Balance	ND
	Zilversmit	38-55
	Fécale	55-60
Hamster	Transport lymphatique	ND
	Balance	67
	Zilversmit	40-58
	Fécale	44-50
Cobaye	Transport lymphatique	ND
	Balance	ND
	Zilversmit	30-47
	Fécale	34-55
Lapin	Transport lymphatique	60-80
	Balance	ND
	Zilversmit	ND
	Fécale	71-85
Chien	Transport lymphatique	80
	Balance	81
	Zilversmit	70-76
	Fécale	70-89
Primate	Transport lymphatique	34-65
	Balance	37-55
	Zilversmit	43-46
	Fécale	34-54
Homme	Transport lymphatique	31-45
	Balance	38-48
	Zilversmit	42-52
	Fécale	40-55

Tableau 6. Pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol suivant les espèces et les méthodes de mesure, d'après Wang et al., 2003 (ND, non disponible).

IV.1.2 Méthode fécale (Fecal dual-isotope ratio method)

Cette méthode, la plus souvent utilisée en expérimentation animale, consiste en une administration orale d'une solution contenant du cholestérol radio-marqué ($[^{14}\text{C}]$ -cholestérol) et un phytostérol radio-marqué non-absorbable ($[^3\text{H}]$ -sitostanol, le β -sitostérol marqué pouvant être également utilisé). Les échantillons fécaux, récupérés sur une période allant de 1 à 7 jours suivant les études et les espèces, permettent l'extraction des stérols totaux par saponification et la mesure de la radioactivité. On peut alors calculer un pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol par la formule :

$$(([\text{14C}]/[\text{3H}] \text{ solution administrée} - [\text{14C}]/[\text{3H}] \text{ feces}) / [\text{14C}]/[\text{3H}] \text{ solution administrée}) * 100$$

La validité de cette méthode repose sur la durée de collecte des fèces. En effet, pour ne pas surestimer l'absorption du cholestérol, la collecte s'effectue jusqu'à ce que la radioactivité du sitostanol devienne négligeable (Wang et al., 2003). Etant donné les différences de temps de transit intestinal entre petits et grands animaux, le temps de collecte optimal est de 4 jours pour la souris (Wang et al., 2003) et le rat (Borgstrom, 1968), 5 jours pour le lapin (Massaro et al., 1977), 7 à 8 jours pour l'homme (Quintao et al., 1971). Néanmoins, une collecte de 7 jours a été utilisée par Melchior chez le chien (Melchior et al., 1985).

IV.1.3 Méthode de la balance des stérols

Cette méthode nécessite un état physiologique stationnaire de l'individu (poids, apports alimentaires, excrétion des stérols fécaux) sur lequel on effectue les mesures (Lin et al., 1980; Wang et al., 2003). L'avantage de cette méthode repose sur l'absence d'utilisation de traceurs. Elle nécessite néanmoins la détermination exacte des quantités quotidiennes de cholestérol alimentaire ingérées, des quantités quotidiennes de cholestérol biliaires et la mesure quotidienne des stérols neutres dans les fèces pour calculer le pourcentage d'absorption par la formule :

$$((\text{Cholestérol alimentaire} + \text{cholestérol biliaire}) - \text{stérols neutres fécaux}) / \text{cholestérol alimentaire} * 100$$

IV.1.4 Méthode de Zilversmit (dual-isotope ratio method)

La méthode de Zilversmit (Zilversmit, 1972) apparaît comme la plus simple des méthodes indirectes de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol. Auparavant basée sur l'utilisation de radioisotopes, cette méthode a été adaptée aux isotopes stables chez l'homme (Bosner et al., 1999). Le protocole consiste en l'administration simultanée de deux isotopes du cholestérol, par voies orale ($[^2\text{H}_5]$ -cholestérol) et intraveineuse ($[^2\text{H}_6]$ -cholestérol) et par la mesure du rapport $[^2\text{H}_5]/[^2\text{H}_6]$ 48 à 72 heures (suivant les espèces) après administration. On peut ainsi calculer le pourcentage d'absorption du cholestérol avec la formule suivante (Bosner et al., 1999):

$$[^2\text{H}_5]/[^2\text{H}_6]_{\text{plasma}} / [^2\text{H}_5]/[^2\text{H}_6]_{\text{solution administrée}} \times 100$$

Dans cette méthode, on considère que la dose intraveineuse administrée représente une absorption totale (100% d'absorption) et que les deux isotopes ont un comportement métabolique similaire: ils s'équilibrent rapidement dans le pool de cholestérol et leurs enrichissements isotopiques évoluent en parallèle au cours du temps. Avec ce parallélisme, le rapport plasmatique est alors constant (Samuel et al., 1978) au bout de 48 heures chez le rat (Chaikoff et al., 1952), 72 heures chez le hamster (Turley et al., 1994) et l'homme (Samuel et al., 1978; Bosner et al. 1999).

IV.1.5 Utilisation des phytostérols comme marqueurs de l'absorption intestinale

Comme on l'a indiqué plus haut, l'absorption intestinale du cholestérol est régulée par les récepteurs NPC1L1 et ABCG5/G8. Or ces récepteurs régulent également l'absorption des phytostérols. Ainsi, si l'on considère que leur absorption est corrélée à celle du cholestérol (Tilvis et al., 1986), les phytostérols plasmatiques, détectables grâce à la spectrométrie de masse, représenteraient des marqueurs de l'absorption intestinale du cholestérol. Cette méthode a été largement utilisée par Miettinen et Gylling pour montrer l'augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol par les statines (Miettinen et al., 2003) et sa diminution dans le syndrome d'insulinorésistance ((Pihlajamäki et al., 2004; Gylling et al., 2004). Malgré le caractère peu invasif de cette méthode, l'inconvénient majeur repose sur le fait que les concentrations en phytostérols sont évidemment influencées par le régime alimentaire. Ce

facteur peut aboutir à de fausses interprétations (Vanstone et al., 2004). Ainsi, dans une étude menée par Joki et al., des taux élevés de phytostérols avaient-ils fait conclure à une absorption du cholestérol augmentée, chez des patients qui suivaient un régime supplémené en huile de colza, source de stérols végétaux (Joki et al., 2003).

IV.1.6 Mesure de l'absorption intestinale du cholestérol chez le chien

L'absorption intestinale du cholestérol a été évaluée grâce aux méthodes précédemment décrites (Melchior et al., 1985; Pertsemlidis et al., 1973), hormis celle des phytostérols. Ces différentes méthodes appliquées au chien ont donné des résultats très concordants, indiquant un pourcentage d'absorption intestinale situé entre 70 et 95%. Avec le lapin (60-80%), le chien présente donc des valeurs plus élevées que celles mesurées chez d'autres espèces comme la souris (25-45%), le porc, le singe et l'homme (30-55%), le rat et le hamster (40-60%). Du fait de sa taille, le chien est un modèle intéressant pour l'étude de l'absorption intestinale du cholestérol. Les effets d'un régime hypercholestérolémique (Melchior et al., 1985) et d'une diversion biliaire (Pertsemlidis et al., 1973) ont par exemple été étudiés sur cet animal.

IV.2 Exploration cinétique du métabolisme des HDL

IV.2.1 Aspects méthodologiques

Le métabolisme des lipoprotéines se caractérise par sa complexité. Des mesures statiques des taux de lipides et de lipoprotéines ne donnent pas d'informations précises sur les mécanismes impliqués dans les dyslipidémies associées à l'insulinorésistance. Les études cinétiques, basées sur le marquage des apolipoprotéines et des lipides grâce à l'utilisation de radio-isotopes et plus récemment d'isotopes stables, ont permis une avancée considérable dans les connaissances sur le métabolisme des lipoprotéines en situation physiologique et pathologique. Nous ne résumerons ici que les points essentiels concernant les études cinétiques.

Méthodes de marquage

Le marquage exogène par les radio-isotopes fut le premier mode de marquage des lipoprotéines. La méthode consiste à isoler les lipoprotéines d'un sujet pour en marquer la partie protéique avec un marqueur radioactif (iode ^{125}I) puis à les réinjecter dans l'organisme pour la mesure de la décroissance radioactive (McFarlane, 1958). Cette méthode pose des problèmes éthiques et pratiques quant à l'utilisation de matériel radioactif et aux conséquences physico-chimiques très variables d'une manipulation *in vitro* des lipoprotéines.

Les radio-isotopes peuvent également être utilisés pour le marquage endogène. La technique consiste à utiliser une molécule entrant dans la voie de biosynthèse de la protéine ou du lipide étudié. On peut citer par exemple la ^3H -leucine pour le marquage des apolipoprotéines (Fischer et al., 1997) ou le ^{14}C -mévalonate pour le marquage du cholestérol (Schwartz et al., 1978). Néanmoins, les limitations d'ordre éthique et pratique sont toujours présentes.

La question de ces limitations ne se pose plus depuis l'utilisation des isotopes stables dans les années 1990. Les isotopes stables sont présents naturellement en faible quantité par rapport à leur élément respectif et sont inoffensifs. Les isotopes les plus couramment utilisés sont le ^2H , le ^{13}C , le ^{15}N et le ^{18}O . Leur mesure est plus difficile que celle des radio-isotopes, mais le développement des techniques de spectrométrie de masse a permis de résoudre ce

problème technique. Plusieurs acides aminés ($^2\text{H}_3$ -valine, $^2\text{H}_2$ -lysine, ^{13}C -phénylalanine, ^{13}C -leucine, $^2\text{H}_3$ -leucine) sont utilisés pour le marquage des apolipoprotéines sans en affecter les paramètres cinétiques (Lichtenstein et al., 1990). Néanmoins, la leucine reste la plus utilisée. En effet, cet acide aminé est essentiel, il est métabolisé majoritairement dans le muscle (et non dans le foie) en acide α -cétoisocaproïque (KIC) et non en un autre acide aminé. Concernant le métabolisme lipidique, le $^2\text{H}_5$ -glycérol et le ^{13}C -palmitate permettent de marquer les triglycérides. Le ^{13}C -acétate permet d'étudier le métabolisme du cholestérol (Ouguerram et al., 2002) puisque cet acide gras entre dans la voie de biosynthèse du cholestérol (pour revue, Chan et al., 2004).

Administration du traceur

L'administration d'un traceur peut se faire soit par l'administration d'un bolus, par une perfusion à débit constant ou par combinaison de ces deux méthodes. Parhofer et al. ont montré, lors d'un marquage protéique par isotopes stables, que les résultats obtenus pour l'apo B100 des VLDL ne différaient pas selon la méthode utilisée (Parhofer et al., 1991). La perfusion constante a souvent été utilisée pour étudier les cinétiques de l'apo A-I avec isotopes stables. La combinaison des deux méthodes de marquage, perfusion et bolus, permet d'obtenir davantage d'informations. En perfusant un acide aminé marqué, il est possible d'étudier sa cinétique d'incorporation dans toutes les protéines du corps et plus spécifiquement les apolipoprotéines. Il en est de même pour le cholestérol en perfusant un précurseur de sa synthèse.

L'incorporation du traceur se faisant au cours du temps, des prélèvements sanguins réguliers permettent de déterminer l'enrichissement en traceur et d'obtenir des courbes d'enrichissement de la molécule tracée. Ensuite, on procède à l'étape de modélisation, c'est-à-dire à l'analyse cinétique et mathématique des courbes afin d'obtenir des informations sur le métabolisme de la molécule étudiée.

Analyse cinétique par modélisation:définitions

Le système est un ensemble biologique, composé de différentes parties ayant des liens entre elles, et dans lequel évolue un certain nombre de molécules. Le terme tracé correspond à la substance naturellement présente dans le système biologique. Le traceur est un « fac-similé »

de la substance tracée devant avoir le même comportement que le tracé dans le système étudié (devenir métabolique identique à la substance tracée) et dont l'introduction ne perturbe pas l'équilibre du système étudié, tout en étant détectable. La modélisation, sous sa forme compartimentale, consiste en l'élaboration d'un modèle (exemple figure 22) qui représente un système subdivisé en plusieurs compartiments ayant de nombreuses interrelations entre eux. Un compartiment peut se définir comme un sous-ensemble d'éléments cinétiquement homogènes et distincts des autres éléments du système.

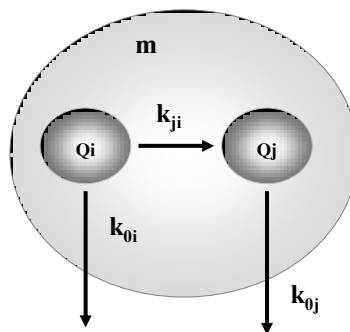


Figure 22. Exemple de modèle

Un compartiment peut échanger de la matière avec d'autres compartiments. Ces échanges sont définis par des flux. Par exemple, les échanges entre deux compartiments i et j sont définis par un flux (F_{ji}), exprimé en quantité de matière Q_i transféré du compartiment i au compartiment j par unité de temps.

$$F_{ji} = k_{ji} \cdot Q_i$$

où Q_i est la quantité de substance dans le compartiment i et k_{ji} un coefficient de transfert égal à la fraction de Q_i empruntant F_{ji} par unité de temps. En d'autres termes, k_{ji} correspond à la probabilité qu'à une particule du compartiment i d'emprunter F_{ji} par unité de temps. On peut exprimer k_{ji} en h^{-1} ou $jour^{-1}$ (ou encore pool/h ou pool/jour) : si $k_{ji} = 0,1 \text{ h}^{-1}$ alors 10 % de Q_i emprunte F_{ji} par heure et la probabilité qu'à chaque molécule de Q_i d'emprunter F_{ji} est de 10% par heure.

Equations différentielles

Un compartiment i subit des entrées ainsi que des sorties modifiant ainsi Q_i . Il peut alors être décrit par une équation différentielle du premier ordre dQ_i/dt . La somme des flux entrant dans le système est égale à la somme des flux qui en sortent. Ainsi, l'équation différentielle représentant le bilan massique instantané du compartiment i est :

$$dQ_i/dt = F_{im} - F_{ni} = k_{im} \cdot Q_m - k_{ni} \cdot Q_i$$

Avec F_{im} et F_{ni} représentant les flux d'entrée et de sortie respectivement.

Dans le cas d'un système massiquement équilibré, les masses de tous les compartiments sont constantes ainsi que les flux massiques de l'ensemble des processus. Ceci se traduit par $dQ_i/dt = 0$ et $F_{im} = F_{ni} = k_{ni} \cdot Q_i$

La masse Q_i du compartiment i est donc déterminée par deux facteurs : le flux d'entrée F_{im} et le paramètre de sortie k_{ni} . Une diminution du paramètre de sortie k_{ni} sans changement du débit d'entrée F_{im} ou encore une augmentation de ce débit d'entrée sans changement du paramètre de sortie k_{ni} entraînent une augmentation de la masse Q_i .

Fractional catabolic rate (FCR) et absolute production rate (APR)

Le taux de catabolisme FCR correspond à la proportion de la masse d'un compartiment qui est renouvelée par unité de temps. Dans la figure 22, le FCR du compartiment i équivaut à la somme des coefficients de transfert quittant le compartiment i ($k_{ji} + k_{oi}$). En conséquence, le temps de résidence d'une substance dans un compartiment correspond à $1/FCR$. On peut évaluer le FCR pour un ensemble de compartiment. Dans notre exemple, le FCR de l'ensemble m s'écrira : $FCR_m = (k_{oi} \cdot Q_i + k_{oj} \cdot Q_j) / (Q_i + Q_j)$.

Dans le cas d'un système massiquement équilibré, lorsque la quantité de substance Q (tracee pool size) est connue, on peut calculer un taux de production APR (absolute production rate) par la formule :

$$APR = FCR \cdot Q$$

Dans les cinétiques d'études du métabolisme des lipoprotéines, la taille du pool (tracee pool size) peut être déterminée par la concentration en substance tracée dans le compartiment, multipliée par le volume plasmatique de diffusion des lipoprotéines.

Analyse cinétique du métabolisme des lipoprotéines par le logiciel SAAMII

Bien que la régression linéaire et les fonctions exponentielles aient été utilisées, la modélisation compartimentale est l'approche la plus appropriée mais aussi la plus complexe pour obtenir le maximum d'informations sur le métabolisme d'une substance donnée (Chan et al., 2004). Le logiciel SAAMII est le plus utilisé dans la pratique de la modélisation compartimentale. Il permet en effet le développement de modèles compartimentaux en plusieurs étapes : (i) création de la structure du modèle, (ii) caractéristique de l'expérience effectuée sur le modèle, (iii) estimation des paramètres et "fitting", (iv) comparaison de modèles. La structure du modèle (i) s'établit sur les connaissances physiologiques du système étudié et sur les données expérimentales disponibles. Cette structure rend compte des différentes interrelations entre les compartiments du modèle mis en place. Une fois le modèle établi, le logiciel SAAMII produit automatiquement les équations différentielles à partir de sa structure compartimentale, l'utilisateur pouvant toutefois y ajouter ses propres équations. La deuxième étape (ii) consiste à préciser les caractéristiques du protocole expérimental, notamment le mode d'administration du traceur et les compartiments associés aux valeurs obtenues après analyses des échantillons. On peut ensuite estimer les paramètres du modèle en ajustant leurs valeurs (iii) jusqu'à obtenir le "best fit", situation où les valeurs calculées par le logiciel se rapprochent le plus des valeurs expérimentales. C'est à ce niveau que les valeurs des paramètres cinétiques (FCR et APR) seront les plus fiables. Néanmoins, d'autres modèles peuvent être développés et comparés entre eux (iv), afin de proposer le meilleur modèle (Chan et al., 2004).

IV.2.2 Métabolisme de l'apolipoprotéine A-I

Les HDL possèdent deux apolipoprotéines de structure, l'apo A-I et l'apo A-II. L'apolipoprotéine A-I étant la principale, les études cinétiques sur les HDL se focalisent le plus souvent sur cette dernière (Frénais et al., 2001; Pont et al., 2002; Batista et al., 2004). Le

métabolisme de l'apo A-I peut être représenté par un modèle monocompartimental (figure 23).

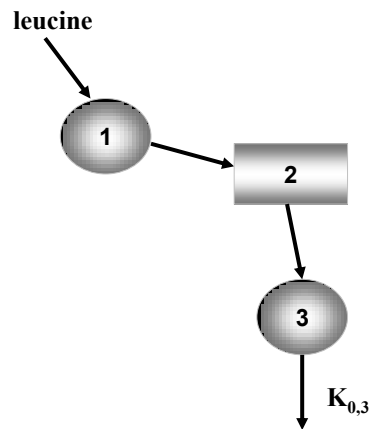


Figure 23. Modèle monocompartimental du métabolisme de l'apo A-I des HDL

Le traceur ($^2\text{H}_3$ -leucine par exemple) est injecté au niveau plasmatique, représenté par le compartiment 1. Le compartiment 2 représente le délai nécessaire à la synthèse et à la sécrétion de l'apo A-I. Enfin le compartiment 3 représente le pool plasmatique d'apo A-I associée aux HDL, avec le paramètre $k(0,3)$ correspondant au FCR de l'apo A-I (Frénais et al., 2001; Pont et al., 2002; Batista et al., 2004). Un modèle multicompartimental plus complexe peut être aussi utilisé (figure 24), avec des compartiments tenant compte de la capture et de la ré-utilisation de la leucine par les pools de synthèse protéique (compartiment 1, 3 et 4) et un compartiment supplémentaire (compartiment 7) représentant l'espace extravasculaire (intestin et lymph). Néanmoins, la nature exacte de ce compartiment reste à décrire (Chan et al., 2004).

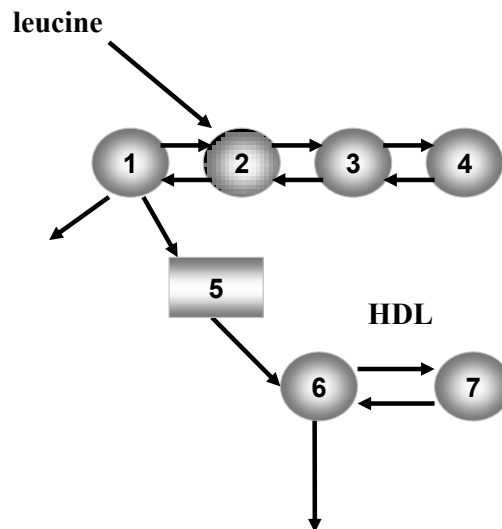


Figure 24. Modèle multicompartmental du métabolisme de l'apo A-I des HDL

Fisher et al. ont également développé un modèle (figure 25) rendant compte d'un pool d'apo A-I plus rapidement métabolisable, représentant 15% de l'apo A-I totale. L'apo A-I quittant le compartiment plasmatique retourne alors dans le pool d'apo A-I majoritaire, qui est en équilibre avec les compartiments extravasculaires (Fisher et al., 1995).

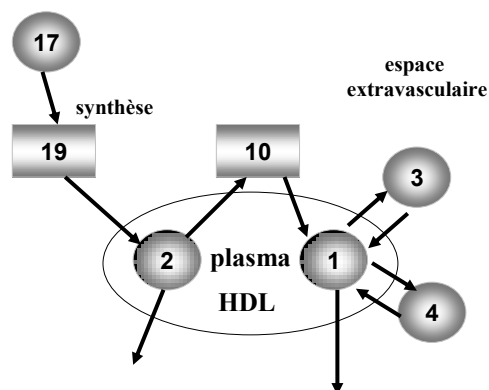


Figure 25. Modèle multicompartmental du métabolisme de l'apo A-I des HDL selon Fisher et al., 1995

D'autres modèles sont également utilisés pour étudier le métabolisme des HDL contenant l'apo A-I et l'apo A-II (figure 26) récemment utilisé par Ji et al. pour étudier le métabolisme des HDL à apo A-I (Lp A-I) et des HDL à apo A-I/A-II (Lp A-I/A-II) chez l'homme. Grâce à ce modèle, Ji et al. ont pu mettre en évidence un catabolisme augmenté des Lp A-I et Lp A-I/A-II chez des sujets insulino-résistants, catabolisme compensé par une surproduction de Lp A-I (Ji et al., 2005).

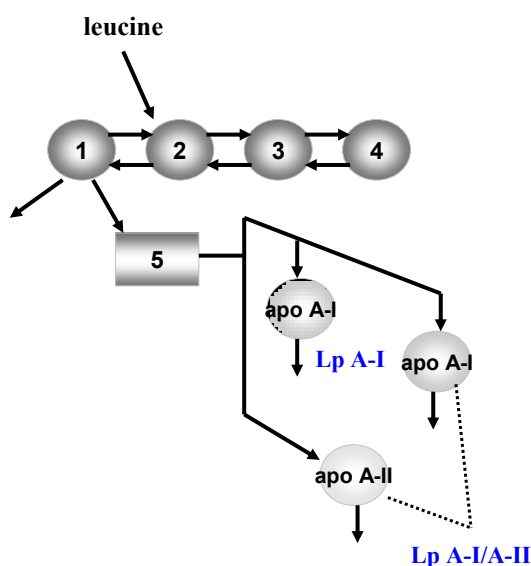


Figure 26. Modèle multicompartimental du métabolisme des HDL Lp A-I et Lp A-I/A-II

IV.2.3 Métabolisme du cholestérol

La première analyse multicompartimentale du système cholestérol a été effectuée chez l'homme par Goodman en 1968 (Goodman et al., 1968). La méthode consistait à injecter par voie intraveineuse du cholestérol marqué et à mesurer pendant 10 semaines la radioactivité spécifique (r.a.s. ou concentration du traceur) du cholestérol plasmatique. Le renouvellement du cholestérol total plasmatique a aussi été mesuré chez le chien par un protocole similaire pendant 7 à 8 semaines (Melchior et al., 1985). L'évolution de cette r.a.s. était assimilée à une équation biexponentielle. La biexponentialité correspondrait à l'existence de deux compartiments, expliquée par la grande différence du comportement du cholestérol des différents organes. Il est connu que certains organes (comme par exemple le foie) ont des

échanges de cholestérol très rapides avec le pool plasmatique, alors que d'autres (comme par exemple le cerveau) présentent au contraire des échanges de cholestérol extrêmement lents.

Néanmoins, l'approche bicompartimentale ne prend pas en compte les échanges multiples du cholestérol plasmatique. La complexité de ces échanges entre les lipoprotéines a été étudiée par Schwartz et al., grâce à un marquage exogène des différentes classes de lipoprotéines. Ces études ont mis en évidence des échanges de cholestérol libre extrêmement rapides entre TRL et HDL (Schwartz et al., 1982) et entre le foie et les HDL (Schwartz et al., 1993). De plus, ces investigations ont mis en évidence le rôle crucial des HDL dans le transport inverse du cholestérol (Schwartz et al., 1993). Enfin, grâce à des injections de mévalonate marqué (Monroe et al., 1983) ou à des perfusions d'acétate (Ouguerram et al., 2002), les échanges d'esters de cholestérol entre lipoprotéines, notamment ceux catalysés par la CETP ont également été quantifiés par des modèles complets sur le renouvellement des esters de cholestérol (figure 27).

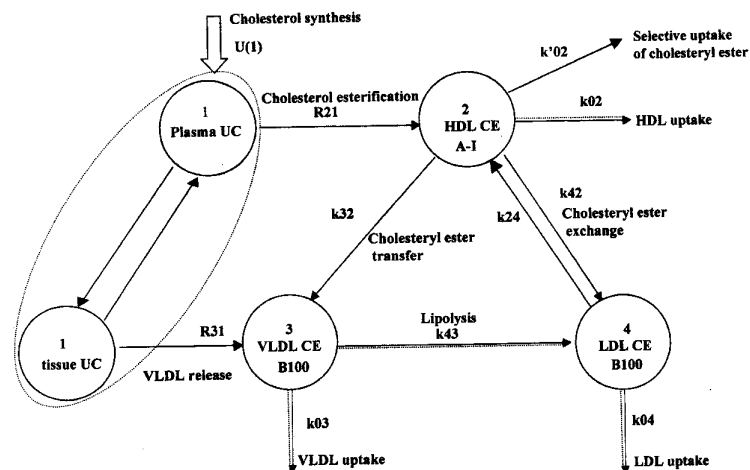


Figure 27. Modèle complet du renouvellement du cholestérol selon Ouguerram et al., 2002

IV.2.4 Exploration cinétique du métabolisme des lipoprotéines chez le chien

Le métabolisme des lipoprotéines chez le chien a été récemment étudié au sein de notre laboratoire. Grâce à des perfusions simultanées de $^2\text{H}_3$ -leucine et de ^{13}C -acétate, nous avons notamment pu mettre en évidence *in vivo* l'absence d'activité CETP (Bailhache et al., 2004). Cette méthode a également permis d'étudier le métabolisme des esters de cholestérol et de l'apo A-I dans les HDL (Ouguerram et al., 2004). Les paramètres cinétiques obtenus montrent que la capture sélective des esters de cholestérol des HDL représente la voie la plus importante du transport inverse du cholestérol chez le chien. L'espèce canine est donc un modèle pertinent pour étudier les conséquences de l'insulinorésistance sur le transport inverse du cholestérol et plus particulièrement la capture sélective du HDL-cholestérol.

TRAVAUX PERSONNELS

V. ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL ET DE LA LIPEMIE POST-PRANDIALE

V.1 Effets de l'atorvastatine sur l'absorption intestinale du cholestérol

V.1.1 Introduction

La mise au point d'une méthode de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol chez le chien a représenté le premier objectif de ce travail. Comme nous l'avons indiqué, plusieurs méthodes basées sur l'utilisation d'isotopes ont été utilisées chez le chien, avec des valeurs de pourcentage d'absorption du cholestérol variant de 70 à 90% suivant les études (voir le tableau 6). La méthode de Zilversmit a été retenue du fait de sa relative simplicité, mais aussi parce qu'une étude antérieure, basée sur l'utilisation de radioisotopes, fournissait des valeurs de référence (Melchior et al., 1985). Contrairement à cette étude, la méthode de Zilversmit a été basée sur l'utilisation d'isotopes stables chez le chien. Cette application a d'ailleurs été validée chez l'homme (Bosner et al., 1999).

Pour valider la transposition de cette méthode, la mesure du pourcentage du cholestérol a été réalisée sur sept chiens sains, avant et après traitement à forte dose d'atorvastatine (5mg/kg/jour). Chez l'homme en effet, l'augmentation de concentration plasmatique en phytostérols chez les patients traités par des statines (atorvastatine et simvastatine) a fait suggérer une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol (Miettinen et al., 2003). Néanmoins, vu l'influence de l'alimentation sur les taux de phytostérols (Vanstone et al., 2004), une mesure basée sur l'utilisation d'isotopes du cholestérol s'avérerait plus fiable et donc nécessaire pour mesurer cet effet potentiel des statines.

V.1.2 Article n°1

Atorvastatin increases Intestinal Cholesterol Absorption in Dog

François Briand, Samuel Serisier, Michel Krempf, Thierry Magot, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen.

J Nutr, sous presse.

Atorvastatin Increases Intestinal Cholesterol Absorption in Dog

François BRIAND^{1,2}, Samuel SERISIER^{1,2}, Michel KREMPF¹, Thierry MAGOT¹, Khadija OUGUERRAM¹, Patrick NGUYEN²

Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes, France

1: INSERM U539, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France

2: Unité de Nutrition et Endocrinologie, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, France

Footnote page

To whom correspondence should be addressed

Patrick Nguyen

Unité de Nutrition et Endocrinologie

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

B.P. 40706 – F 44307 Nantes Cedex 3

Tel : (33)240687635

Fax : (33)240687746

E-Mail: pnguyen@vet-nantes.fr

Abbreviations used: ABC, adenosine triphosphate-binding cassette; apo, apolipoprotein; HDL, high density lipoprotein; LXR, liver X receptor; MTP, microsomal transfer protein; NPC1L1, Niemann-Pick C1 like 1 protein; SR-BI, scavenger receptor class B type I.

INTRODUCTION

Statins are widely used to reduce low-density lipoprotein cholesterol levels and associated cardiovascular events (1). However, intestinal cholesterol absorption is increased in humans treated with statins (2). Inhibition of intestinal sterols absorption therefore represents a new therapy to reduce cholesterol plasma levels (3) but understanding the mechanism involved in sterol absorption needs investigation.

Transgenic and knock-out mice have been widely used to study the mechanisms and receptors involved in cholesterol absorption. In this animal model, Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein has been discovered as the intestinal phytosterol and cholesterol transporter (4), and has been identified as the target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe (5). Adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporters, such as ABCA1, ABCG5 and ABCG8, are also gaining potent interest because activation of the nuclear receptor liver X receptor (LXR) upregulates expression of these transporters and finally inhibits intestinal absorption of cholesterol (6, 7). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) has been localized on both apical and basolateral membranes of intestinal cells (8), but the role of this receptor in cholesterol absorption is unclear.

Very recently, cholesterol transport in mice has been classified into two independently modulated, apolipoprotein (apo) B-dependent and apoB-independent, pathways (9). The ApoB dependent pathway is represented by the chylomicron assembly, mediated by microsomal transfer protein (MTP). MTP activity is essential for the packaging of apolipoprotein and lipids to form chylomicron (10, 11). The apoB-independent pathway involves intestinal apoA-I-containing high density lipoproteins (HDLs) and cholesterol efflux

mediated by the ABCA1 (12). This pathway would represent 25-30% of the total cholesterol absorption in mice (10).

Overall, mechanisms of cholesterol absorption have been mainly studied in rodent models. There is little information, however, about this process in larger animal models such as dog. Because dogs have been used to demonstrate the potent hypocholesterolemic effect of statins and the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe (13), the dog is as a relevant model for investigations of lipid metabolism in obesity and insulin resistance (14). Therefore, there is a great interest in determining the mechanisms involved in intestinal cholesterol absorption in dog. In the present study, the effects of atorvastatin on cholesterol absorption in dogs were assessed with a dual stable isotope method. In order to get further insights into the mechanisms of intestinal cholesterol absorption, we also measured MTP activity and SR-BI expression before and after atorvastatin treatment.

MATERIALS AND METHODS

Seven ovariectomised female beagle dogs, 3 years old (body weight 11.1 ± 0.3 kg) were studied. They were housed according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of Agriculture and Fisheries. Experimental protocols adhered to European Union guidelines and were approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes. Only healthy animals were enrolled: hematocrit $>38\%$, leukocyte count $<18,000/\text{mm}^3$, good appetite, no medications and normal stools. Dogs consumed in a single meal a dry commercial food (27% crude protein, 13% ether extract, 15629 kJ metabolizable energy/kg of food, on a dry matter basis) and were fed according to the National Research Council recommendation (552 kJ metabolizable energy/kg $\text{BW}^{0.75}$). Atorvastatin (TAHOR®, Pfizer, Paris, France) was bought in a local pharmacy and administered at 5mg/kg/day by daily oral gavage for 6 weeks. A duodenum tissue sample was surgically excised after a short, general anesthesia (IMALGENE®1000, Merial, Lyon, France). The biopsy sample was rinsed with ice-cold 0.9% NaCl, split in aliquots and immediately frozen in liquid nitrogen. Duodenum samples were then stored at -80°C until analysis.

Percent cholesterol absorption was assessed using the dual stable isotope method, as previously described (15), based on the simultaneous administration of $[2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6]$ cholesterol ($[^2\text{H}_6]$ cholesterol) given orally and $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_7]$ cholesterol ($[^2\text{H}_7]$ cholesterol) given intravenously. Plasma cholesterol isotope ratio is measured at a set point in time, with intravenous dose assumed as a “100% absorption” reference. $[^2\text{H}_6]$ cholesterol and $[^2\text{H}_7]$ cholesterol were obtained from Eurisotop, Gif-sur-Yvette, France. $[^2\text{H}_6]$ cholesterol for oral administration was completely dissolved in sunflower oil (16mg/ml) by rotating overnight at room temperature and 16mg were placed into the daily meal of each dog.

[²H₇] cholesterol for intravenous administration was dissolved in ethanol at 10mg/ml and filtered through a 0.2µm solvent-resistant filter (Millex-FG, Millipore, Bedford, MA). The ethanolic cholesterol tracer was added drop wise to 4 volumes of freshly opened Endolipide 20% (Braun Medical, Boulogne, France) and gently mixed. Total dissolution of the tracer was checked by confocal microscopy. The day of the experiment, fasted dogs received 8mg of [²H₇] cholesterol through an intravenous NaCl 0.9% sterile infusion for 10 minutes. The syringe was washed twice with NaCl 0.9% solution. Immediately after intravenous administration, dogs consumed a normal meal containing 16mg of [²H₆] cholesterol. Fasting plasma sample for cholesterol enrichment were drawn before and 72 hours after the test.

Non-saponifiable sterols were extracted into hexane after saponification of 0.5mL of plasma and derivatized with N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (60°C, 30 minutes).

Electron-impact gas chromatography-mass spectrometry was performed on a 5891A gas chromatograph connected with a 5971A quadrupole mass spectrometer (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA). Because the principal molecular ion of cholesterol at m/z 458 is too intense, ions were monitored over time at m/z 459 (natural cholesterol), 464 ([²H₆] cholesterol), and 465 ([²H₇] cholesterol). To determine the mole ratio of [²H₆] cholesterol/[²H₇] cholesterol, a standard curve was determined by plotting the area ratio 464/465 against weighed mole ratios of [²H₆] cholesterol/[²H₇] cholesterol diluted in free cholesterol. Percent cholesterol absorption was then calculated as the mole ratio of tracers in plasma at t=72 hours divided by the mole ratio of tracers administered.

Total cholesterol, triglycerides and phospholipids were measured in plasma and duodenum samples using enzymatic methods (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Each duodenum

sample was weighed and homogenized with 1X PBS. Lipids in homogenate were extracted using diisopropylether-butanol (6v/4v). The lipid extract was evaporated under a stream of nitrogen gas and redissolved in absolute ethanol for lipids measurement, expressed as mg/g of tissue. MTP activity was measured using a kit (Roarbiomedical, New York, NY).

Duodenum pieces were homogenized in 1x PBS containing 0.25% Na-deoxycholate, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The supernatant was collected and 50 µg of duodenum protein were resolved on Nu-PAGE 4–12% Bis-Tris gels in MES-SDS buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under reducing conditions. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay kit (Interchim, Montluçon, France). Proteins were transferred onto a Protran nitrocellulose membrane (Schleicher and Shuell, Dassel, Germany), probed with polyclonal rabbit anti-mouse scavenger receptor class B type I (SR-BI; Novus, Littleton, CO) or polyclonal rabbit anti-human apo A-I (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA), using Vectastain PK6101 (AbCys, Paris, France). For each antibody, cross reactivity against canine apo A-I or canine SR-BI was tested, using human plasma HDL or mouse liver, respectively.

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis using StatView 5.0 (SAS institute, Cary, NC) was performed with paired t-Test to determine significant differences between variables for dogs before and after atorvastatin treatment. A 2-sided *P* value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Atorvastatin treatment (5mg/kg/d) decreased significantly plasma total cholesterol (4.82 ± 0.18 to 3.33 ± 0.23 mmol/l, $p < 0.05$), phospholipids (4.52 ± 0.16 to 3.53 ± 0.08 mmol/l, $p < 0.05$) and triglycerides (1.03 ± 0.09 to 0.82 ± 0.07 mmol/l, $p < 0.05$). After atorvastatin treatment, percent cholesterol absorption was higher (74.9 ± 2.9 to 91.5 ± 2.8 %, $p < 0.05$). In duodenum (**Table 1**), total cholesterol was lower ($p < 0.05$), whereas triglycerides and phospholipids did not change. MTP activity was not affected by atorvastatin treatment. Representative immunoblots are shown in **figure 1**. SR-BI expression did not change while apo A-I in duodenum was only detectable with atorvastatin treatment.

DISCUSSION

Atorvastatin treatment (5mg/kg/d) induced a significant decrease in plasma lipids but we measured higher percent cholesterol absorption, using a dual stable isotope method. In duodenum, this effect was not associated with any increase of either MTP activity or SR-BI expression, while apo A-I expression was higher.

Higher cholesterol absorption has been reported in humans treated with atorvastatin at 80 mg/day (2). However, this effect was measured with plant sterols as markers of cholesterol absorption and this method was limited because plasma plant sterols concentration depends on the diet (16). We therefore used the dual isotope method to assess higher percent cholesterol absorption with atorvastatin treatment in dog. The mean percent cholesterol absorption before atorvastatin treatment (74.9 ± 2.9 %) was close to the 73% value previously reported in dogs with the same method (17). The present results therefore strengthen the accuracy of the dual isotope method to measure cholesterol absorption and its modulation by pharmacologic or nutritional factors.

Because mechanisms involved in the up-regulation of cholesterol absorption with statin treatment remain unclear, we investigated the role of both apoB-dependent and –independent pathways in intestinal cells. Although there were no change in phospholipids or triglycerides concentrations, atorvastatin treatment reduced cholesterol concentration in duodenum. This did not affect MTP activity and a role of the apoB-dependent pathway would therefore be unlikely, because MTP has been recognized as a central player in this pathway in mouse and cellular models (11, 12). Up-regulation of cholesterol absorption during atorvastatin treatment may therefore occur through the apoB-independent pathway that involves apo A-I,

ABCA1 and intestinal HDL. However, a higher apo A-I expression in intestine during atorvastatin treatment was the only piece of evidence for this theoretical possibility. This result is consistent with increased cholesterol secretion with HDL observed when free apo A-I is supplied to isolated enterocytes (10).

Although SR-BI would be involved in enterocyte lipid trafficking (18), its expression did not change despite higher cholesterol absorption and decreased cellular cholesterol levels. Because cholesterol absorption was not decreased in SR-BI knock-out mice (19, 20), this receptor was described as not essential in intestinal cholesterol absorption and this was demonstrated again in our study. Reduced cholesterol content activates other receptors involved in cholesterol absorption, namely NPC1L1 and ABCA1 proteins. In mice, NPC1L1 and ABCA1 expression has been shown to be down-regulated by elevated cellular cholesterol concentration (4, 21). Moreover, ABCA1 is involved in the apoB-independent pathway and contributes to HDL-apo A-I secretion by the intestine (12). Up-regulation of NPC1L1 and ABCA1 expression would therefore explain higher cholesterol absorption with atorvastatin, but this will require further studies.

We concluded that atorvastatin treatment increases cholesterol absorption in dog, using a dual stable isotope method, even though we did not use control dogs in this study. Our data suggested that increased absorption occurs through an apo B-independent pathway. Although other investigations are needed to describe the cellular mechanism of cholesterol transfer from intestinal lumen to the secretion of chylomicron, dog could be a relevant model to study nutritional and pharmacological effects on cholesterol absorption. The combination of lipid lowering drugs (e.g. statins, fibrates) and cholesterol absorption inhibitors represents an exciting strategy to prevent coronary artery disease. Because the inhibition of apoB-

dependent pathways via MTP antagonists has not been successful (11), understanding the apoB-independent pathway will be important in developing dyslipidemia treatment with cholesterol absorption inhibition.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Samuel Ninet for its technical assistance.

LITTERATURE CITED

1. Schaefer EJ, Brousseau ME. Perspectives: Benefits of reducing low-density lipoprotein cholesterol concentrations to <100 mg/dL. *Prev Cardiol*. 2000;3:136-9.
2. Miettinen TA, Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:976-82.
3. Sudhop T, Lutjohann D, von Bergmann K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Ther*. 2005;105:333-41.
4. Davis HR Jr., Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*. 2004;279: 33586-92.
5. Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR Jr., Dean DC, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:8132-7.
6. Knight BL, Patel DD, Humphreys SM, Wiggins D, Gibbons GF. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J lipid Res*. 2003;44:2049-58.

7. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem.* 2003;278:36091-8.
8. Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res.*2001;42:902-9.
9. Iqbal J, Hussain MM. Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. *J Lipid Res.*2005;46:1491-501.
10. Iqbal J, Anwar K, Hussain MM. Multiple, independently regulated pathways of cholesterol transport across the intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:31610-20.
11. Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1300:151-70.
12. Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:281-5.
13. Davis HR Jr., Pula KK, Alton KB, Burrier RE, Watkins RW. The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in

combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in dogs. *Metabolism*. 2001;50:1234-41.

14. Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, Ouguerram K. Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism*. 2003;52:559-64.

15. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*. 1999;40:302-8.

16. Vanstone CA, Jones PJ. Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:340-1.

17. Melchior GW, Harwell JF. Cholesterol absorption and turnover in hypercholesterolemic dogs. *J Lipid Res*. 1985;26:306-15.

18. Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Danielsen, EM. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*. 2003;52:1424-31.

19. van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC et al. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry*. 2005;44:4517-25.

20. Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res.* 2001;42:170-80.
21. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM et al. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers . *Science.* 2000;289:1524-29.

Table 1: Lipids concentration and microsomal transfer protein activities in duodenum (mean $\pm$ SEM, n=7, *p<0.05)

	before	after
Total cholesterol (mg/g)	0.78 $\pm$ 0.18	0.64 $\pm$ 0.14*
Triglycerides (mg/g)	0.13 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02
Phospholipids (mg/g)	2.17 $\pm$ 0.40	1.68 $\pm$ 0.19
MTP activity (pmol/h/ μ g)	0.706 $\pm$ 0.162	0.711 $\pm$ 0.182

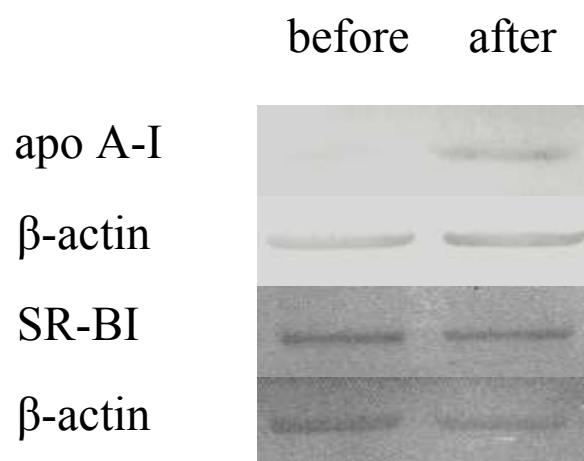


Figure 1: Representative immunoblot for apo A-I and SR-BI expression in duodenum before and after atorvastatin treatment. B-actin was used as a loading control.

V.1.3 Discussion

L'application de la méthode de Zilversmit, basée sur l'utilisation des isotopes stables chez le chien, a permis dans un premier temps de mesurer un pourcentage égal à 75% chez les chiens à l'état sain. Cette valeur est très comparable à celle publiée précédemment par Melchior (73%, Melchior et al., 1985). Dans les études utilisant cette méthode chez le chien (Pertsemlidis et al., 1973; Melchior et al., 1985), les prélèvements plasmatiques s'étaient effectués sur plusieurs semaines. Dans notre étude le prélèvement plasmatique était effectué à 72 heures, puisque lors d'essais préliminaires, nous avons constaté que les rapports isotopiques ne variaient pas entre 24 et 96 heures.

Dans un deuxième temps, l'augmentation du pourcentage d'absorption chez le chien traité par l'atorvastatine (5mg/kg/jour) confirme les données obtenues chez l'homme, où les traitements à base de statines augmentent les concentrations en phytostérols, marqueurs indirects de l'absorption intestinale du cholestérol (Miettinen et al., 2003).

L'augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol a permis d'étudier certains acteurs de ce mécanisme dans l'entérocyte, comme le récepteur SR-BI, la MTP et l'apo A-I. La présente étude confirme le rôle mineur du SR-BI dans le processus d'absorption du cholestérol, comme précédemment établi chez la souris SR-BI^{-/-} (Mardones et al., 2001). Même si nos résultats suggèrent une stimulation de la voie apo B-indépendante, des études plus approfondies des récepteurs tels qu'ABCA1, ABCG5, ABCG8 et NPC1L1 seront nécessaires pour confirmer ces données. Une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol via l'apo A-I et les HDL n'apparaît pas nocive au niveau cardiovasculaire, puisque l'entérocyte contribuerait ainsi à alimenter le pool d'apolipoprotéine A-I et de HDL-cholestérol plasmatique. En effet, on le verra plus loin, l'atorvastatine à la dose de 5mg/kg/jour produit une augmentation significative de la production de l'apo A-I (Briand et al., 2006, article n°5). La production intestinale d'apo A-I reste néanmoins à déterminer. Chez l'homme, la contribution intestinale au pool d'apo A-I plasmatique a été estimée à 10% (Ikewaki et al., 1993).

Cependant, l'augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol lors d'un traitement à base de statines justifie l'administration simultanée d'un inhibiteur d'absorption intestinale du cholestérol tel que l'ezetimibe. Comparée à une monothérapie basée sur l'administration d'une statine seule, cette association médicamenteuse provoque en effet une réduction beaucoup plus importante du LDL-cholestérol chez l'homme (McKenney et al.,

2005). L'effet hypocholestérolémiant cumulé par cette association s'explique par la relation inverse entre synthèse et absorption intestinale du cholestérol, observée chez les patients traitées par une statine (Miettinen et al., 2003) et chez les patients insulino-résistants (Pihlajamäki et al., 2004; Gylling et al., 2004) par dosage des phytostérols (campestérol, sitostérol) et des précurseurs du cholestérol (cholesténol, desmostérol, lathostérol). Même si elle n'est pas évoquée dans ce premier article, cette relation a pu être suggérée en mesurant une baisse significative du cholestérol hépatique chez les sept chiens traités (1.09 ± 0.20 vs 0.63 ± 0.08 mg/g de foie, $p < 0.05$). Cette baisse du pool hépatique pourrait entraîner une baisse de la sécrétion biliaire de cholestérol, favorisant ainsi l'absorption du cholestérol alimentaire. Cependant, l'effet hypocholestérolémiant de l'atorvastatine sur l'entérocyte lui-même influencerait l'expression des récepteurs impliqués dans l'absorption intestinale du cholestérol (NPC1L1, ABCG5/G8, ABCA1). Des études complémentaires sur l'expression de ces récepteurs sont néanmoins nécessaires pour détailler les mécanismes provoquant l'augmentation de l'absorption du cholestérol.

Malgré ces données manquantes, cette première étude a permis avant tout de transposer la méthode de Zilversmit chez le chien. Cette méthode a ensuite été utilisée pour mesurer les effets de l'insulino-résistance sur l'absorption intestinale du cholestérol (article n°2).

V.2 Effets de l'insulinorésistance sur l'absorption intestinale du cholestérol et sa re-sécrétion dans les chylomicrons

V.2.1 Introduction

D'après les études menées chez l'homme, l'insulinorésistance serait associée à une moindre absorption intestinale du cholestérol avec, en parallèle, une augmentation de sa synthèse (Pihlajamäki et al., 2004; Gylling et al., 2004). Par ailleurs, les études menées sur les modèles animaux du syndrome d'insulinorésistance suggèrent une surproduction intestinale de lipoprotéines, suite à un accroissement de la synthèse d'apoB48 et de la lipogenèse entérocytaire (Haidari et al., 2002; Zoltowska et al. 2003). Cependant, la re-sécrétion du cholestérol alimentaire dans les chylomicrons n'était pour l'instant pas connue dans ces conditions.

La phase postprandiale jouant un rôle prépondérant dans l'athérosclérose, l'étude de ces mécanismes sur le chien obèse insulinorésistant apparaissait essentielle pour le développement du modèle animal. L'objectif de ce travail a donc été dans un premier temps de mesurer l'absorption intestinale du cholestérol en situation d'insulinorésistance. Nous avons utilisé pour cela la méthode de Zilversmit.

Dans un deuxième temps, l'étude des conséquences de l'insulinorésistance sur la lipémie postprandiale s'avérait également nécessaire. Pour limiter les variations des concentrations plasmatiques en lipides durant la phase postprandiale, nous avons administré régulièrement pendant 8 heures de petites quantités d'aliments de manière à établir un modèle postprandial proche d'un état stationnaire. Sur ce modèle expérimental, en administrant un isotope stable du cholestérol ([3,4-¹³C₂]-cholestérol) à t₀, nous avons pu suivre l'apparition du traceur dans les chylomicrons au cours de cette phase postprandiale.

V.2.2 Article n°2

Intestinal Cholesterol Absorption and Chylomicron Resecretion in Obese Insulin Resistant Dogs

François Briand, Natacha Ripoche, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen, Khadija Ouguerram.

Eur J Nutr, soumis.

Intestinal Cholesterol Absorption and Chylomicron Resecretion in Obese Insulin Resistant Dogs.

Briand et al.

François BRIAND^{1,2}, Natacha RIPOCHE¹, Thierry MAGOT¹, Michel KREMPF¹, Patrick NGUYEN², Khadija OUGUERRAM¹

Centre de Recherche en Nutrition Humaine,

1: INSERM U539, CHU Nantes, France

2: Unité Nutrition et Endocrinologie, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, France

Corresponding Author:

Khadija OUGUERRAM, PhD

Centre de Recherche en Nutrition Humaine

INSERM U539, CHU Nantes

1 place Alexis Ricordeau

44093 Nantes Cedex 01, France

Tel : (33)240087535

Fax : (33)240087544

Khadija.Ouguerram@univ-nantes.fr

Abstract

We aim to investigate the effects of insulin resistance on intestinal absorption and chylomicron resecretion of dietary cholesterol in dogs.

Six healthy beagle dogs were overfed for 25 weeks to induce insulin resistance. Percent cholesterol absorption was assessed with the dual isotope method. [3,4-¹³C₂]-cholesterol was given orally to study tracer enrichment in chylomicron during an 8-hour postprandial state. Hepatic and intestinal lipids as well as microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity were also measured.

Insulin resistant dogs showed higher total cholesterol, triglycerides (TG) and free fatty acids (FFA) levels in both fasting and postprandial states ($p < 0.05$). Percent cholesterol absorption was lower (86.5 ± 5.1 vs 68.9 ± 1.6 %, $p < 0.05$). Postprandial chylomicron cholesteryl esters area under the curve (AUC) was higher (2.2 ± 0.3 vs 7.8 ± 0.5 , $p < 0.05$), as well as chylomicron triglycerides AUC (4.8 ± 0.5 vs 6.7 ± 0.8 , $p < 0.05$). Chylomicron [3,4-¹³C₂]-free cholesterol AUC was lower in insulin resistant dogs (0.164 ± 0.023 vs 0.122 ± 0.017 , $p < 0.05$) but chylomicron [3,4-¹³C₂]-cholesteryl esters AUC did not change. Total cholesterol, TG, FFA levels and MTP activity were all higher ($p < 0.05$) in liver. There was no change in duodenum.

Although insulin resistant dogs show lower intestinal cholesterol absorption and reduced chylomicron free cholesterol resecretion, this animal model is characterized by both fasting and postprandial dyslipidemia.

Key words: insulin resistance, cholesterol absorption, chylomicron, postprandial, dog.

Introduction

Prolonged postprandial hyperlipidemia and increased triglyceride-rich lipoprotein (TRL) levels are important cardiovascular risk factors in type 2 diabetes and associated insulin resistance [1,2]. Evidence for a TRL-cholesterol deposition in atherosclerotic plaques has been described in animal models and humans [3-5], with TRL-cholesteryl esters (CE) as the predominant atherogenic lipids in this mechanism [5]. In insulin resistance, increased production of TRL is a major characteristic of dyslipidemia [6] and has hepatic and intestinal origins. On one hand, high levels of plasma free fatty acids (FFA) drive the overproduction of hepatic very low density lipoprotein (VLDL) [7]. On the other hand, recent animal and human studies suggest an over-secretion of chylomicron from the intestine [8,9], with higher synthesis rate of intestinal apolipoprotein (apo) B48 [8], the major protein of chylomicron. Higher activity of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), in both liver [10] and intestine [8,9], may play a major role in TRL overproduction. Overall, TRL overproduction and concomitant lower lipoprotein lipase (LPL) activity [11] drive the accumulation of atherogenic lipoproteins in postprandial states.

Although secretion of chylomicron from the intestine is raised, insulin resistance seems to decrease intestinal cholesterol absorption with a concomitant increased cholesterol synthesis in humans [12-15]. The mechanism involved in this decrease remains poorly understood, although higher ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/G8) expression and/or increased biliary cholesterol secretion have been suggested to play a role [12]. Intestinal absorption and chylomicron resecretion of dietary cholesterol have been mainly investigated in healthy humans [16, 17] but the effects of insulin resistance on these mechanisms remain unclear.

We have previously described a dog model of obesity-associated insulin resistance [18], with similar metabolic disorders seen in humans with the metabolic syndrome, such as high

plasma triglycerides and FFA levels. In order to better characterize this canine model, we studied intestinal absorption and chylomicron resecretion of dietary cholesterol in healthy and insulin resistant states. Percent cholesterol absorption was assessed using the dual stable isotope method [19]. Chylomicron resecretion of dietary cholesterol was measured during a 8-hour postprandial study after administration of [3,4-¹³C₂]-cholesterol given orally. To give insights into the effects of insulin resistance on TRL metabolism, we also investigated post-heparin plasma LPL activity, as well as hepatic and intestinal lipids levels and MTP activity.

Materials and methods

Animals and diet. Six adult male beagle dogs (body weight: 13.9 ± 1.2 kg, age 8.0 ± 0.8 year) were studied. Animals were housed at the National Veterinary School of Nantes according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of Agriculture. The experimental protocol adhered to European Union guidelines and was approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes. Clinical examinations, blood cell counts, and biochemistry were performed before the study to ensure that all animals were in good health. Healthy dogs consumed in a single meal a dry commercial food (25% crude protein, 14% ether extract, 4024 kcal metabolizable energy/kg) and were fed according to the National Research Council recommendation ($132 \text{ kcal metabolizable energy/kg BW}^{0.75}$). In order to induce obesity, dogs were given 1.6-fold their energetic need with a second dry commercial food (32% crude protein, 20% ether extract, 4256 kcal metabolizable energy/kg) in two meals per day for 25 weeks. Insulin sensitivity was assessed, as previously described [20], using euglycemic hyperinsulinemic clamp technique in conscious dogs, before weight gain and when BW gain was at least 40% of initial BW. Insulin sensitivity (IS) was calculated as the mean glucose infusion rate (mg/kg/min) divided by the mean plasma insulin ($\mu\text{U/ml}$) of the last 60 minutes of the clamp.

Assessment of percent cholesterol absorption. Percent cholesterol absorption was assessed using the dual stable isotope method, as previously described [19]. [2,2,3,4,4,6- $^2\text{H}_6$] cholesterol ($[\text{}^2\text{H}_6]$ cholesterol) and [25,26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_7$] cholesterol ($[\text{}^2\text{H}_7]$ cholesterol) were obtained from Eurisotop, Gif-sur-Yvette, France. $[\text{}^2\text{H}_6]$ cholesterol for oral administration was completely dissolved in sunflower oil (16mg/ml) by rotating overnight at room temperature. $[\text{}^2\text{H}_7]$ cholesterol for intravenous administration was dissolved in ethanol at 10mg/ml and filtered through a 0.2 μ solvent-resistant filter (Millex-FG, Millipore, Bedford, MA). The ethanolic cholesterol tracer was added drop wise to 4 volumes of freshly opened Endolipide 20% (Braun Medical, Boulogne, France) and gently mixed. Total dissolution of the tracer was checked by confocal microscopy. The day of the experiment, fasted dogs received 8mg of $[\text{}^2\text{H}_7]$ cholesterol through an intravenous NaCl 0.9% sterile infusion during 10 minutes. The syringe was washed twice with NaCl 0.9% solution. Immediately after intravenous administration, dogs (healthy or insulin resistant) consumed 200g of the first dry commercial food (described above) containing 16mg of $[\text{}^2\text{H}_6]$ cholesterol. Fasting plasma sample for cholesterol enrichment were drawn before and 72 hours after the test. Non-saponifiable sterols were extracted into hexane after saponification of 0.5mL of plasma and derivatized with N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (60°C, 30 minutes). Electron-impact gas chromatography-mass spectrometry was performed on a 5891A gas chromatograph connected with a 5971A quadrupole mass spectrometer (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA). Because the principal molecular ion of cholesterol at m/z 458 is too intense, ions monitored over time at m/z 459 (natural cholesterol), 464 ($[\text{}^2\text{H}_6]$ cholesterol), and 465 ($[\text{}^2\text{H}_7]$ cholesterol). To determine the mole ratio of $[\text{}^2\text{H}_6]$ cholesterol/ $[\text{}^2\text{H}_7]$ cholesterol, a standard curve was determined by plotting the area ratio 464/465 against weighed mole ratios of $[\text{}^2\text{H}_6]$ cholesterol/ $[\text{}^2\text{H}_7]$ cholesterol diluted in free cholesterol. Percent cholesterol

absorption was then calculated as the mole ratio of tracers in plasma at $t=72$ hours divided by the mole ratio of tracers administered.

Postprandial study. One intravenous catheter was placed on the jugular vein on 17-hour fasted dogs for blood sampling. At $t=0$, 30mg of $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ -cholesterol dissolved in 2mL of ethanol were administered orally in 50mL of a food mixture made with one can of a commercial diet (22.8% crude protein, 23.9% ether extract, 3860 kcal metabolizable energy/kg, on a dry matter basis) diluted in 400mL of water. Dogs then received 25mL of this food mixture every 15minutes during 8 hours to maintain a stationary postprandial state. This constantly fed state was chosen to avoid any significant variations in chylomicron cholesterol levels. Venous blood samples were withdrawn in ice-cold ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Venoject, Paris, France) at 0, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8h. Plasma was immediately separated by centrifugation at 2000g, 10 min at 4°C. Sodium azide (inhibitor of bacterial growth), protease inhibitor (Interchim, Montluçon, France) and 5,5-dithio-bis-nitro benzoate (DTNB), an LCAT inhibitor, were added to plasma samples.

Liver and duodenum biopsies. Liver and duodenum tissue samples were surgically excised after a short, general anaesthesia with IMALGENE®1000 (MERIAL, Lyon, France) administered intravenously. The samples were rinsed with ice-cold 0.9% NaCl, split in aliquots and immediately frozen in liquid nitrogen. Liver and duodenum samples were then stored at -80°C until analysis.

Lipoprotein lipase activity. Pre and post-heparin blood samples were drawn into ice-cold heparin tubes before and 10 minutes after iv injection of 100UI heparin/kg at the end of the kinetic protocol. Plasma was separated at 4°C and frozen at -80°C until assayed. LPL activity was determined using a commercial kit (RoarBiomedical, New York, NY).

Fast protein liquid chromatography. Fast protein liquid chromatography (FPLC) plasma analysis was performed at room temperature using two P-500 pumps (1 MPa), a MV-7 plate multi-injection with a 200 µl loop, an ultraviolet (UV) monitor UV-1, a FRAC-100 fraction collector, and a LCC-501 Plus controller. All operations were monitored by absorbance at 280 nm. The system was controlled by FPLC DIRECTOR software (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Orsay, France). Elution was performed in a 1 mM EDTA, 154 mM NaCl, and 0.02% NaN₃ (pH 8.2) buffer. The buffer was filtered through a 0.22 µm filter (Membrane filters type GV, Duropore[®], Millipore, Bedford, MA, USA). The column was washed with an aqueous ethanol solution (20%). Two hundred microliters from a postprandial plasma sample (corresponding to time 3h in the postprandial study) were injected and elution was performed at a flow of 0.35 ml/min. Approximately 0.35 ml fraction were collected. An entire profile was completed within 105 min. The columns were washed for 50 min at the end of each run. Total cholesterol and triglycerides in odd fractions was determined as described above. Apo B48 was studied with coomassie staining corresponding to pooled TRL fractions (fraction 3-13), performed after resolving on Nu-PAGE[®] 3–8% Tris-acetate gels in Tris-acetate buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under reducing conditions.

Analytical procedures. Three-mL plasma samples were overlaid with 4 mL of 0.9% NaCl containing 2 mM EDTA (density 1.006 g/mL) to isolate chylomicron by ultracentrifugation, using a fixed angle rotor at 10000g, 20min at 20°C. Chylomicron fraction was then removed in the top 1.2mL. Chylomicron lipids were extracted with butanol:diisopropylether (4:6, v:v). Analysis of cholesterol and measurement of ¹³C enrichments using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) in chylomicron were performed as previously described [21]. Tracer enrichments were expressed in atom percent excess (APE). Areas under the curve (AUC) were calculated from tracer enrichment curves. Total cholesterol, triglycerides and phospholipids were measured using enzymatic methods

(BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Non esterified fatty acids (NEFA) and free cholesterol were measured with a kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma and chylomicron lipids during postprandial studies were quantified using AUC. To determine lipids content in liver and duodenum, each sample was weighed and homogenized with 1X PBS. Lipids in homogenate were extracted using diisopropylether-butanol (6v/4v). The lipid extract was evaporated under a stream of nitrogen gas and redissolved in absolute ethanol for lipids measurement, expressed as mg/g of tissue. MTP activity was determined with a commercial kit (RoarBiomedical, New York, NY).

Statistical analysis. Data are reported as means $\pm$ SEM. Statistical analysis using StatView 5.0 (SAS institute, Cary, NC) was performed with the Wilcoxon paired test to determine significant differences between parameters before and after atorvastatin treatment. A 2-sided *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Characteristics of the 6 studied animals. Table 1 shows the characteristics of dogs before (healthy) and after (insulin resistant) an overfeeding period of 25 weeks (n=6). There was a significant 40% body weight increase (13.9 ± 2.3 vs 19.3 ± 3.2 kg, $p < 0.05$). Glucose infusion during euglycemic hyperinsulinemic clamp was lower (16.3 ± 1.7 vs 12.0 ± 1.3 mg/kg/min, $p < 0.05$), as well as insulin sensitivity (0.16 ± 0.04 vs 0.07 ± 0.01 , $p < 0.05$). Plasma total cholesterol was significantly higher (4.42 ± 0.18 vs 5.76 ± 0.51 mM) as well as triglycerides (0.86 ± 0.07 vs 1.33 ± 0.12 mM, $p < 0.05$). Phospholipids did not change. Free fatty acids increased significantly (0.85 ± 0.06 vs 1.06 ± 0.05 mM, $p < 0.05$). Post-heparin LPL activity was lower (1.75 ± 0.10 vs 1.53 ± 0.10 , $p < 0.05$), as well as percent cholesterol absorption (86.5 ± 5.1 vs 68.9 ± 1.6 %, $p < 0.05$) in insulin resistant dogs.

Postprandial studies. Figure 1 shows total cholesterol and triglycerides levels in plasma (Figure 1A) and chylomicron (Figure 1B) during postprandial studies (n=6). In both

healthy and insulin resistant dogs, plasma cholesterol levels were stable throughout the study (figure 1A). Chylomicron cholesterol levels slightly increased during the first 2 hours of the study (not significantly) and then remained constant throughout the study (see figure 1B). Triglycerides levels increased during the first 3 hours ($p<0.05$), both in plasma (figure 1A) and chylomicron (figure 1B). After 3 hours, triglycerides levels reached a plateau. Plasma and chylomicron lipids AUC are shown in Table 2. Plasma total cholesterol and triglycerides AUC were higher in insulin resistant dogs (27.4 ± 1.5 vs 33.6 ± 3.3 ; 8.1 ± 0.6 vs 10.0 ± 0.8 , respectively, $p<0.05$ for both). Plasma phospholipids AUC did not change. Plasma free fatty acids AUC was higher (3.7 ± 0.6 vs 5.6 ± 0.9 , $p<0.05$). Chylomicron total cholesterol AUC did not change. Chylomicron cholesteryl esters AUC increased significantly after hyperenergetic diet (2.2 ± 0.3 vs 7.8 ± 0.5 , $p<0.05$), as well as triglycerides (4.8 ± 0.5 vs 6.7 ± 0.8 , $p<0.05$). There was no change in chylomicron phospholipids AUC.

Chylomicron ^{13}C -free cholesterol and -cholesteryl esters enrichment curves are shown in figure 2. Chylomicron ^{13}C -free cholesterol enrichment increased continuously throughout the 8-hour postprandial study with a less important increase in insulin resistant dogs (figure 2A). Chylomicron ^{13}C -cholesteryl esters enrichments (figure 2B) were lower than ^{13}C -free cholesterol. Tracer enrichment peaked at hours 2.5 and 3, and decreased to reach a plateau during the last three hours. Chylomicron ^{13}C -cholesteryl esters enrichments tended to be lower in insulin resistant dogs. Areas under the curve were then calculated from tracer enrichment curve to quantify the effects of insulin resistance on cholesterol chylomicron resecretion (see table 2). Chylomicron ^{13}C -free cholesterol AUC values were lower (0.164 ± 0.023 vs 0.122 ± 0.017 , $p<0.05$) in insulin resistant dogs. However, there was no significant change for chylomicron ^{13}C -cholesteryl esters enrichments AUC (0.084 ± 0.016 vs 0.070 ± 0.020).

Fast protein liquid chromatography. A postprandial plasma lipoprotein profile from a representative dog is shown in figure 3. Insulin resistant dogs showed higher total cholesterol levels (figure 3A) in TRL (chylomicron+VLDL), LDL and HDL fractions. As expected, insulin resistance induced higher triglycerides levels in TRL fractions, with higher apoB48 levels, as shown with a representative coomassie staining.

Liver and duodenum biopsies. Liver and duodenum lipids levels and MTP activity are shown in table 3. Hepatic total cholesterol was higher (0.58 ± 0.05 vs 0.73 ± 0.09 mg/g, $p < 0.05$), as well as triglycerides (0.53 ± 0.13 vs 0.71 ± 0.16 mg/g, $p < 0.05$) and free fatty acids (2.26 ± 0.25 vs 2.91 ± 0.33 mg/g, $p < 0.05$) in insulin resistant dogs. Hepatic phospholipids did not change. Hepatic MTP activity was higher (73.0 ± 9.6 vs 102.6 ± 9.9 pmol/h, $p < 0.05$). All lipids levels, as well as MTP activity were unchanged in duodenum.

Discussion

The effects of insulin resistance on intestinal cholesterol absorption and chylomicron resecretion were investigated in dogs. Insulin resistant dogs showed a lower percent cholesterol absorption (86.5 ± 5.1 vs 68.9 ± 1.6 %, $p < 0.05$), as well as chylomicron ^{13}C -free cholesterol AUC (0.164 ± 0.023 vs 0.122 ± 0.017 , $p < 0.05$). However, chylomicron ^{13}C -cholesteryl esters AUC did not change and postprandial state was characterized by both higher chylomicron triglycerides and cholesteryl esters AUC ($p < 0.05$). Our results suggest that insulin resistance induces fasting and postprandial dyslipidemia in dogs, even though intestinal cholesterol absorption efficiency is lower.

Insulin resistance has been associated with lower intestinal cholesterol absorption in humans [12-15] but the mechanisms involved in this decrease remain poorly understood. One might speculate that higher ABCG5/G8 expression through liver X receptor activation [22] would decrease intestinal cholesterol absorption, but this theoretical mechanism in insulin

resistance has not been investigated in the present study. Another relevant mechanism would be an increased hepatic cholesterol synthesis that would result in higher biliary cholesterol secretion. In transgenic mice, biliary cholesterol concentration has been shown to be strongly and inversely correlated with percent cholesterol absorption [23]. Given that elevated cholesterol synthesis increases biliary cholesterol secretion in obese human subjects [15], higher hepatic cholesterol concentration in obese insulin resistant dogs could contribute to enlarge intestinal cholesterol pool, thereby resulting in lower absorption efficiency. Although further investigations on ABCG5/G8 expression and biliary cholesterol secretion are needed, the present results (lower cholesterol absorption and higher hepatic cholesterol concentration) support the close relationship between cholesterol absorption and cholesterol synthesis described in humans. However, lower intestinal cholesterol absorption would not prevent higher intestinal production of atherogenic particles, as shown by the increased chylomicron cholesteryl esters AUC ($p < 0.05$). Thus, resecretion of ^{13}C -chylomicron free cholesterol was significantly lower in insulin resistant dogs but ^{13}C -cholesteryl esters chylomicron enrichment did not change. In human intestinal cell line Caco-2, insulin has been shown to decrease the activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2), the enzyme involved in cholesterol esterification in enterocyte [24]. It is therefore possible that ACAT2 activity would be higher with insulin resistance in dogs, thereby increasing the esterification rate of intestinally absorbed cholesterol. In mice, ACAT2-derived cholesteryl esters have been shown to be the predominant atherogenic lipids in blood [5]. Overall, our results suggest that cholesterol would be less absorbed but more esterified and atherogenic in insulin resistant dogs.

This atherogenic process might be exacerbated by a higher chylomicron production, a mechanism previously described elsewhere [8,9]. Intestinal lipoprotein overproduction has been related to increased MTP activity in animal models of insulin resistance [25, 26] and

humans with type 2 diabetes [9]. In contrast, using *Psammomys obesus*, a rat model of insulin resistance, Zoltowska et al. have found higher intestinal lipoprotein production in the absence of any changes in MTP activity, even though lipid synthesis was increased [27]. In the present study, MTP activity and lipids concentration were significantly higher in liver but there was no change in duodenum. However, liver and duodenum biopsies were extracted in fasted dogs. It is possible that the effects of insulin resistance on both intestinal lipid synthesis and MTP activity would mainly occur during postprandial state in dogs. These mechanisms, concomitant with a lower LPL activity, would then contribute to increase TRL-apoB48 levels (figure 3B).

Although the present results give some insights into the metabolism of chylomicron cholesterol, some limitations of the present study should be recognized. First, intestinal lipoprotein oversecretion was not directly quantified because we did not measure apoB48 production. Higher synthesis rate of apo B48, the major protein of intestinally-derived lipoprotein, has been shown in animal models of insulin resistance [8,28]. Although representative lipoprotein profile showed higher TRL-apoB48 levels, it should be noted that apoB48 is synthesized by both liver and intestine in dogs [29]. Intestinally-derived apoB48 can be only isolated from chylomicron fractions. However, given that apoB48 catabolism is very high [30], it was difficult to stain chylomicron-apoB48 as a single band on a gel (data not shown), while it was easily done with TRL (figure 3B). In these conditions, the hepatic contribution to the TRL-apoB48 pool is therefore not known. Second, as discussed above, activity of ACAT2 and expression of receptors such as ABCG5/G8 should be measured to further describe the effects of insulin resistance on intestinal cholesterol metabolism.

In conclusion, insulin resistant dogs show lower percent intestinal cholesterol absorption and lower chylomicron free cholesterol resecretion. However, the dietary

cholesterol absorbed by the enterocyte might be efficiently esterified, thereby resulting in higher chylomicron cholesteryl esters levels.

References

- [1] F. Karpe, G. Steiner, K. Uffelman, T. Olivecrona, A. Hamsten, Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis, *Atherosclerosis* 106 (1994) 83-97.
- [2] F.H. De Man, M.C. Cabezas, H.H. Van Barlingen, D.W. Erkelens, T.W. de Bruin, Triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus: post-prandial metabolism and relation to premature atherosclerosis, *Eur J Clin Invest* 26 (1996) 89-108.
- [3] S.D. Proctor, J.C. Mamo, Intimal retention of cholesterol derived from apolipoprotein B100- and apolipoprotein B48-containing lipoproteins in carotid arteries of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 1595-600.
- [4] S. Pal, K. Semorine, G.F. Watts, J. Mamo, Identification of lipoproteins of intestinal origin in human atherosclerotic plaque, *Clin Chem Lab Med* 41 (2003) 792-5.
- [5] R.G. Lee, K.L. Kelley, J.K. Sawyer, R.V. Jr Farese, J.S. Parks, L.L. Rudel, Plasma cholesteryl esters provided by lecithin:cholesterol acyltransferase and acyl-coenzyme a:cholesterol acyltransferase 2 have opposite atherosclerotic potential, *Circ Res* 95 (2004) 998-1004.
- [6] R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, The metabolic syndrome, *Lancet* 365 (2005) 1415-28.

- [7] G.F. Lewis, K.D. Uffelman, L.W. Szeto, B. Weller, G. Steiner, Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans, *J Clin Invest* 95 (1995) 158-66.
- [8] G.F. Lewis, K. Uffelman, M. Naples, L. Szeto, M. Haidari, K. Adeli, Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster, *Endocrinology* 146 (2005) 247-55.
- [9] C. Phillips, K. Mullan, D. Owens, G.H. Tomkin, Intestinal microsomal triglyceride transfer protein in type 2 diabetic and non-diabetic subjects: The relationship to triglyceride-rich postprandial lipoprotein composition, *Atherosclerosis* [Epub ahead of print] 2005
- [10] W. Qiu, C. Taghibiglou, R.K. Avramoglu, S.C. Van Iderstine, M. Naples, H. Ashrafpour, S. Mahpsekar, R. Sato, K. Adeli, Oleate-mediated stimulation of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene promoter: implications for hepatic MTP overexpression in insulin resistance, *Biochemistry* 44 (2005) 3041-9.
- [11] V. Pruneta-Delocche, A. Sassolas, G.M. Dallinga-Thie, F. Berthezene, G. Ponsin, P. Moulin, Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes, *J Lipid Res* 45 (2004) 859-65.
- [12] P.P. Simonen, H.K. Gylling, T.A. Miettinen, Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity, *Diabetes Care* 25 (2002) 1511-5.

- [13] J. Pihlajamaki, H. Gylling, T.A. Miettinen, M. Laakso, Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men, *J Lipid Res* 45 (2004) 507-12.
- [14] D.C. Chan, G.F. Watts, P.H. Barrett, F.H. O'Neill, G.R. Thompson, Plasma markers of cholesterol homeostasis and apolipoprotein B-100 kinetics in the metabolic syndrome, *Obes Res* 11 (2003) 591-6.
- [15] T.A. Miettinen, H. Gylling, Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity, *Atherosclerosis* 153 (2000) 241-8.
- [16] J. Ferezou, J. Rautureau, T. Coste, E. Gouffier, F. Chevallier, Cholesterol turnover in human plasma lipoproteins: studies with stable and radioactive isotopes, *Am J Clin Nutr* 36 (1982) 235-44.
- [17] G. Beaumier-Gallon, C. Dubois, M. Senft, M.F. Vergnes, A.M. Pauli, H. Portugal, D. Lairon, Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans, *Am J Clin Nutr* 73 (2001) 870-7.
- [18] E. Bailhache, P. Nguyen, M. Krempf, B. Siliart, T. Magot, K. Ouguerram, Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs, *Metabolism* 52 (2003) 559-64.
- [19] M.S. Bosner, R.E. Jr Ostlund, O. Osofisan, J. Grosklos, C. Fritschle, L.G. Lange, Assessment of percent cholesterol absorption in humans with stable isotopes, *J Lipid Res* 34 (1993) 1047-53.

- [20] E. Bailhache, K. Ouguerram, C. Gayet, M. Krempf, B. Siliart, T. Magot, P. Nguyen, An insulin-resistant hypertriglyceridaemic normotensive obese dog model: assessment of insulin resistance by the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in combination with the stable isotope technique, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87 (2003) 86-95.
- [21] K. Ouguerram, M. Krempf, C. Maugeais, P. Maugere, D. Darmaun, T. Magot, A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans, *Metabolism* 51 (2002) 5-11.
- [22] L. Yu, J. York, K. von Bergmann, D. Lutjohann, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8, *J Biol Chem* 278 (2003) 15565-70.
- [23] E. Sehayek, J.G. Ono, S. Shefer, L.B. Nguyen, N. Wang, A.K. Batta, G. Salen, J.D. Smith, A.R. Tall, J.L. Breslow, Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10194-9.
- [24] S. Jiao, J.B. Moberly, T.G. Cole, G. Schonfeld, Decreased activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase by insulin in human intestinal cell line Caco-2, *Diabetes* 38 (1989) 604-9.
- [25] C. Phillips, D. Owens, P. Collins, G.H. Tomkin, Microsomal triglyceride transfer protein: does insulin resistance play a role in the regulation of chylomicron assembly?, *Atherosclerosis* 160 (2002) 355-60.

- [26] M. Haidari, N. Leung, F. Mahbub, K.D. Uffelman, R. Kohen-Avramoglu, G.F. Lewis, K. Adeli, Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction, *J Biol Chem* 277 (2002) 31646-55.
- [27] M. Zoltowska, E. Ziv, E. Delvin, D. Sinnett, R. Kalman, C. Garofalo, E. Seidman, E. Levy, Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in *Psammomys obesus*: a model of insulin resistance and type 2 diabetes, *Diabetes* 52 (2003) 2539-45.
- [28] Q. Guo, R.K. Avramoglu, K. Adeli, Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids, *Metabolism* 54 (2005) 689-97.
- [29] J. Greeve, I. Altkemper, J.H. Dieterich, H. Greten, E. Windler, Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins, *J Lipid Res* 34 (1993) 1367-83.
- [30] A.F. Stalenhoef, M.J. Malloy, J.P. Kane, R.J. Havel, Metabolism of apolipoproteins B-48 and B-100 of triglyceride-rich lipoproteins in normal and lipoprotein lipase-deficient humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984) 1839-43.

Figure legends

Figure 1. Plasma (A) and chylomicron (B) postprandial total cholesterol ($\circ$) and triglycerides (Δ) levels, in healthy (open symbols, full lines) and insulin resistant (closed symbols, dashed lines) dogs.

Figure 2. ^{13}C -free cholesterol (A) and -cholesteryl esters (B) enrichment in chylomicron, in healthy (open symbols, full lines) and insulin resistant (closed symbols, dashed lines) dogs.

Figure 3. Postprandial plasma total cholesterol (A) and triglycerides (B) lipoprotein profile from a representative dog, healthy (open symbols, full lines) and insulin resistant (closed symbols, dashed lines). A representative coomassie staining from pooled fractions corresponding to triglyceride rich lipoprotein (TRL) is also represented (IR, insulin resistant).

TABLE 1

Characteristics of the 6 studied animals before (healthy) and after (insulin resistant) an overfeeding period of 25 weeks

AU, arbitrary units,* p<0.05

	Healthy	Insulin resistant
Body weight (kg)	13.9 ± 2.3	19.3 ± 3.2*
Glucose infusion (mg/kg/min)	16.3 ± 1.7	12.0 ± 1.3*
Insulin sensitivity (AU)	0.16 ± 0.04	0.07 ± 0.01*
Total cholesterol (mM)	4.42 ± 0.18	5.76 ± 0.51*
Triglycerides (mM)	0.86 ± 0.07	1.33 ± 0.12*
Phospholipids (mM)	4.09 ± 0.30	4.30 ± 0.20
Free fatty acids (mM)	0.85 ± 0.06	1.06 ± 0.05*
Lipoprotein lipase activity (AU)	1.75 ± 0.10	1.53 ± 0.1*
% cholesterol absorption	86.5 ± 5.1	68.9 ± 1.6*

TABLE 2

Plasma and chylomicron lipids areas under the curve (AUC) calculated from postprandial studies (n=6)

AU, arbitrary units,* P<0.05

AUC (AU)	Healthy	Insulin resistant
Plasma total cholesterol	27.4 ± 1.5	33.6 ± 3.3*
Plasma triglycerides	8.1 ± 0.6	10.0 ± 0.8*
Plasma phospholipids	26.9 ± 1.9	28.3 ± 1.5
Plasma free fatty acids	3.7 ± 0.6	5.6 ± 0.9*
Chylomicron total cholesterol	11.2 ± 1.1	13.0 ± 0.4
Chylomicron cholesteryl esters	2.2 ± 0.3	7.8 ± 0.5*
Chylomicron triglycerides	4.8 ± 0.5	6.7 ± 0.8*
Chylomicron phospholipids	10.1 ± 0.8	12.1 ± 0.7
13C-chylomicron free cholesterol	0.164 ± 0.023	0.122 ± 0.017*
13C-chylomicron cholesteryl esters	0.084 ± 0.016	0.070 ± 0.020

TABLE 3

Lipids levels and microsomal triglyceride transfer protein activity in liver and duodenum (n=6)

* P<0.05

Liver	Healthy	Insulin resistant
Total cholesterol (mg/g)	0.58 ± 0.05	0.73 ± 0.09*
Triglycerides (mg/g)	0.53 ± 0.13	0.71 ± 0.16*
Free fatty acids (mg/g)	2.26 ± 0.25	2.91 ± 0.33*
Phospholipids (mg/g)	2.41 ± 0.13	2.79 ± 0.36
MTP activity (pmol/h)	73.0 ± 9.6	102.6 ± 9.9*
Duodenum	Healthy	Insulin resistant
Total cholesterol (mg/g)	0.68 ± 0.07	0.72 ± 0.06
Triglycerides (mg/g)	0.39 ± 0.06	0.39 ± 0.06
Free fatty acids (mg/g)	1.34 ± 0.15	1.47 ± 0.21
Phospholipids (mg/g)	1.48 ± 0.14	1.70 ± 0.19
MTP activity (pmol/h)	121.4 ± 6.7	115.2 ± 11.1

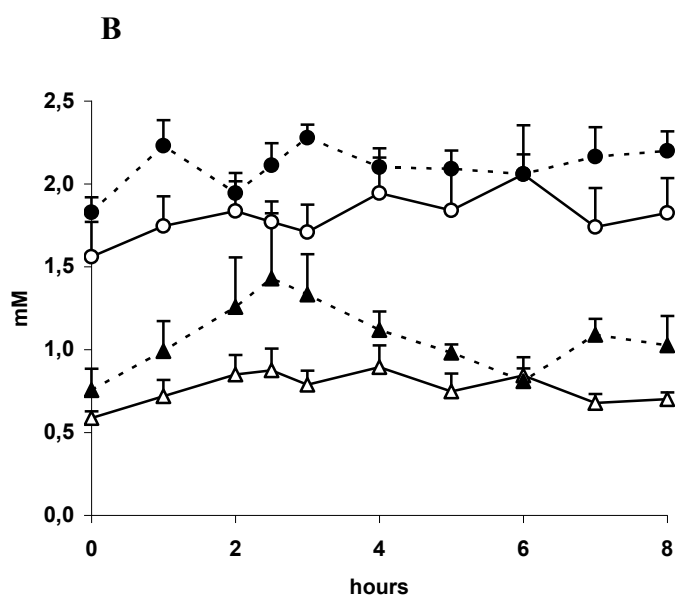
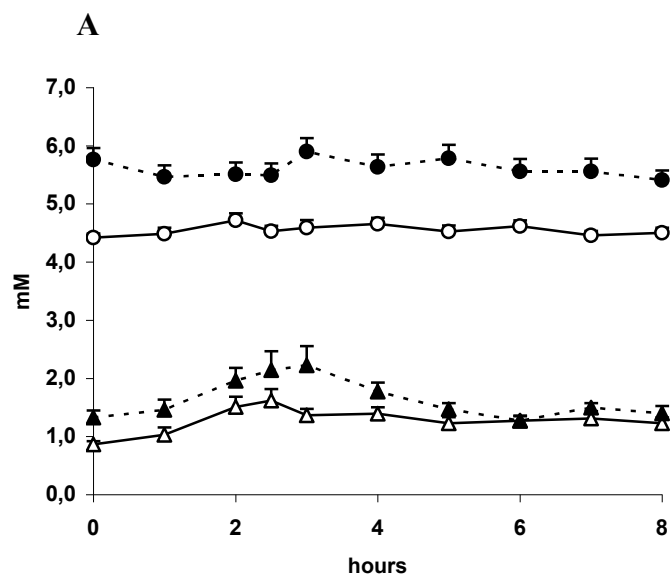


Figure 1

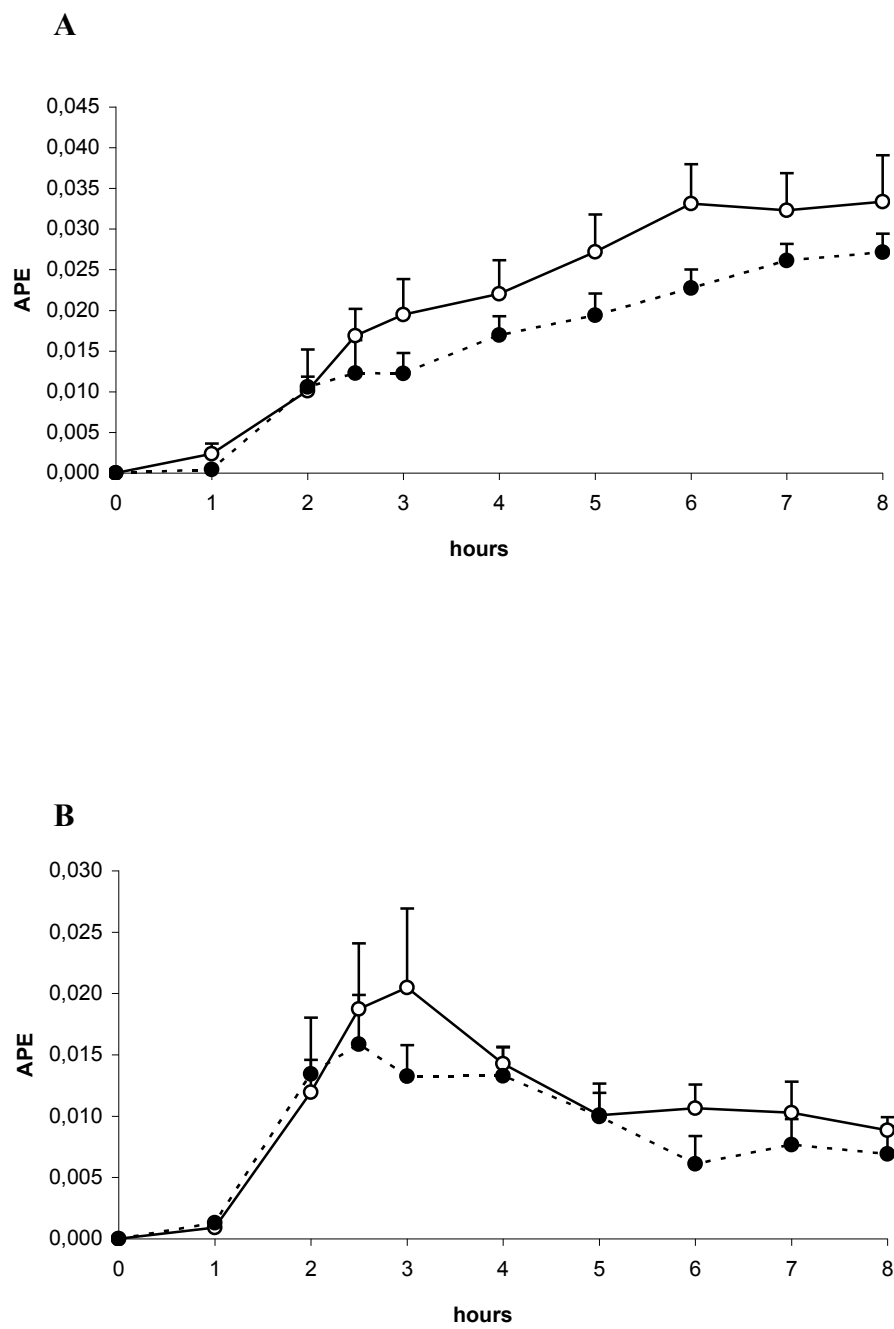


Figure 2

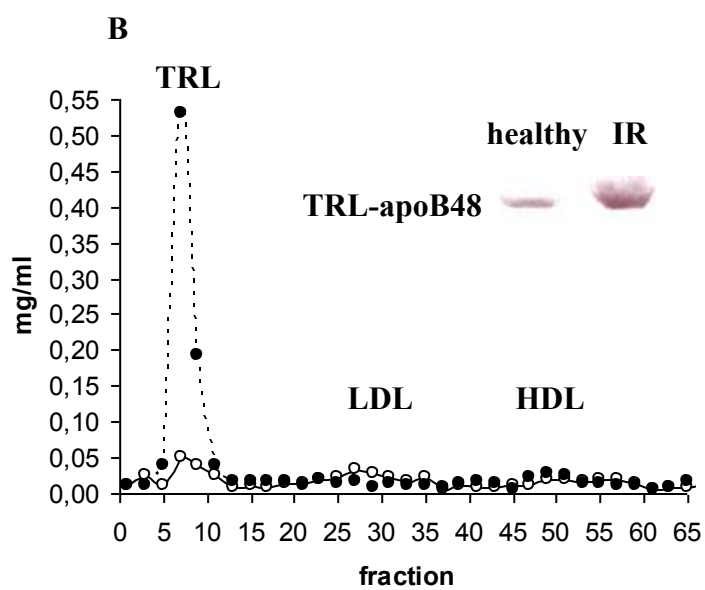
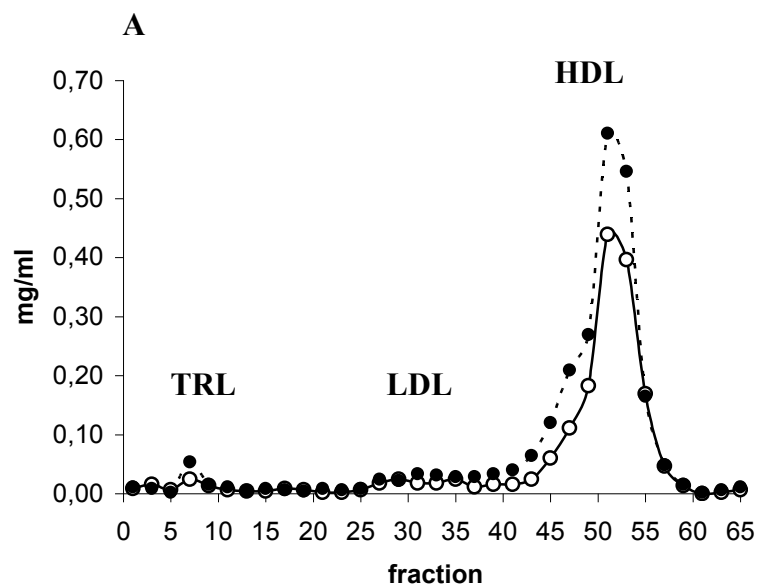


Figure 3

V.2.3 Discussion

La mesure du pourcentage d'absorption chez le chien obèse insulino-résistant indique une moindre absorption intestinale du cholestérol. Cet effet de l'insulino-résistance a été décrit chez l'homme, mais les mécanismes impliqués n'ont été que peu étudiés. Dans notre étude, l'augmentation des taux hépatiques de cholestérol suggère une influence des contenus biliaires en cholestérol qui seraient augmentés en situation d'insulino-résistance. Cependant, nous n'avons pas de données à ce niveau. D'autre part, des données sur les récepteurs, tels que ABCG5/G8, mais aussi NPC1L1, ABCA1, impliqués dans l'absorption intestinale seraient également nécessaires.

En situation d'insulino-résistance, les enrichissements en ^{13}C -cholestérol sont significativement diminués mais on ne rapporte pas de changements significatifs concernant les esters de cholestérol. De plus, nous rapportons une augmentation significative de la concentration en esters de cholestérol dans les chylomicrons. Ce mécanisme impliquerait une augmentation de l'activité de l'ACAT2 intestinale en situation d'insulino-résistance, ce qui reste à démontrer. En effet, l'ACAT2 influencerait potentiellement l'absorption du cholestérol. Chez la souris ACAT2^{-/-}, l'absorption du cholestérol est diminuée de 30 à 40%, voire plus lorsque le régime est enrichi en cholestérol (Repa et al., 2004). Cependant, l'inhibition de l'activité intestinale de l'ACAT2 chez le hamster n'affecte que la formation des esters de cholestérol sans altérer la re-sécrétion du cholestérol libre au niveau plasmatique (Burrier et al., 1995). Les effets de l'insulino-résistance sur l'activité de l'ACAT2 dans l'entérocyte ne sont pas connus. Un mécanisme impliquant une moindre absorption du cholestérol au niveau apical mais une estérification accrue du cholestérol dans l'entérocyte expliquerait nos résultats.

Afin de suivre l'enrichissement du ^{13}C -cholestérol (libre et estérifié) dans un état postprandial stationnaire, les chiens étaient nourris avec 25mL de solution nutritive tous les $\frac{1}{4}$ d'heure. Sachant qu'ils recevaient exactement la même quantité à l'état sain qu'à l'état insulino-résistant, les chiens ingéraient l'équivalent d'un repas quotidien sur 8 heures. Néanmoins, il était plus délicat d'obtenir une triglycéridémie stationnaire chez les chiens insulino-résistants. Chez ces derniers, les taux de triglycérides plasmatiques augmentaient au temps 2 et 3 heures pour revenir ensuite à des valeurs proches de la triglycéridémie à jeun.

(figure 1A). Les mécanismes responsables de ce phénomène ne sont pas connus. Cependant, même si les taux de triglycérides dans les chylomicrons semblent suivre la même tendance, les valeurs de concentration dans ces particules restaient toujours supérieures à la valeur du t0, indiquant que les chiens demeuraient dans un état postprandial.

Comme chez l'homme insulino-résistant, les résultats de la présente étude montrent une moindre absorption intestinale du cholestérol et une dyslipidémie tant à jeun qu'à l'état postprandial. D'autres paramètres mériteraient d'être mesurés pour confirmer une surproduction intestinale de chylomicrons, d'autant plus que nous n'avons pas mesuré de changement d'activité MTP au niveau intestinal. Sur des modèles animaux d'insulino-résistance (Phillips et al., 2002; Lewis et al., 2005) et chez l'homme (Phillips et al., 2005), une activité augmentée de la MTP intestinale a pourtant été suggérée. L'étude du métabolisme de l'apo B48 serait utile pour déterminer la production des lipoprotéines intestinales. Chez le hamster insulino-résistant, une augmentation de la production d'apo B48 a été montrée (Haidari et al., 2002) *in vivo* et *in vitro* (culture primaire d'entérocytes). Contrairement au hamster qui ne synthétise pas d'apo B48 hépatique (Liu et al., 1991), l'apo B48 chez le chien a une double origine intestinale et hépatique (Greeve et al., 1993). Il est donc difficile de distinguer l'apo B48 intestinale de l'apo B48 hépatique, même si les fractions de chylomicrons obtenues par ultracentrifugation ne présentent pas de bandes d'apo B100, lorsque l'on fait migrer ces lipoprotéines sur gel d'électrophorèse. Néanmoins, il est également difficile d'isoler l'apo B48 des chylomicrons sur gel d'électrophorèse. En raison d'un catabolisme élevé, cette protéine apparaît sous la forme de plusieurs bandes. Au contraire, lorsque l'on isole les lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicron et VLDL), l'apo B48 apparaît sous la forme d'une bande unique. A partir de cette fraction, il est ainsi plus facile d'étudier le métabolisme de l'apo B48 chez les espèces qui ne produisent cette protéine qu'au niveau intestinal, comme l'homme (Welty et al., 1999), mais pas le chien.

Néanmoins, la présente étude met en évidence une dyslipidémie postprandiale chez le chien insulino-résistant. Cette caractéristique peut donc être exploitée pour évaluer les effets des traitements hypolipémiants.

V.3 Effets de la rosiglitazone sur la lipémie post-prandiale chez le chien obèse insulino-résistant

V.3.1 Introduction

Comme on l'a évoqué dans l'article précédent, le chien obèse insulino-résistant est caractérisé par une dyslipidémie, tant à l'état de jeûne qu'à l'état postprandial. Dans cette étude, les effets potentiels de la rosiglitazone sur la sensibilité à l'insuline et leurs conséquences sur le métabolisme lipidique et glucidique ont été testés sur notre modèle animal. Outre la mise en évidence de l'efficacité de cette molécule sur la sensibilité à l'insuline, notre objectif était de mesurer les effets du traitement sur les paramètres lipidiques, plus particulièrement en phase postprandiale. En effet, il apparaissait important de souligner l'intérêt du chien obèse insulino-résistant pour tester les effets d'une molécule hypolipémiante lors de la phase postprandiale.

V.3.2 Article n°3

Rosiglitazone Improves Insulin Sensitivity and Lipid Metabolism in Obese Insulin Resistant Dogs.

Erik Max Wulff, François Briand, Khadija Ouguerram, Brigitte Siliart, Keld Fosgerau, Marianne Ølholm Larsen, Patrick Nguyen.

Soumis à *Eur J Pharmacol*.

Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lipid metabolism in obese insulin resistant dogs.

Briand et al.: rosiglitazone in obese insulin resistant dog

Erik Max WULFF^{1,*}, François BRIAND^{2,3*}, Khadija OUGUERRAM³, Brigitte SILIART², Keld FOSGERAU¹, Marianne Ølholm LARSEN⁴, Patrick NGUYEN².

1: Pharmacology research 2, Novo Nordisk Inc., 2760, Maloev, Denmark

2: Unité de Nutrition et Endocrinologie, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, France

3 : INSERM U539, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

4 : Pharmacology research 1, Novo Nordisk Inc., 2760, Maloev, Denmark

* : The authors participated equally to this work

Corresponding Author:

Patrick Nguyen

Unité de Nutrition et Endocrinologie

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

B.P. 40706 – F 44307 Nantes Cedex 3

Tel : (33)240687635

Fax : (33)240687746

E-Mail: pnguyen@vet-nantes.fr

The objective was to investigate the effects of rosiglitazone in obese insulin resistant dogs.

Seven obese insulin resistant beagle dogs were studied before and after rosiglitazone treatment (2mg/kg/day for 4 weeks). Insulin sensitivity was assessed using euglycemic hyperinsulinemic clamp. Glucose tolerance was measured with intravenous glucose tolerance test. Plasma glucose and lipids were measured during a 7h-hour postprandial state.

Infused glucose to maintain basal glycemia during euglycemic hyperinsulinemic clamp was significantly higher after rosiglitazone treatment (9.9 ± 1.1 vs 13.9 ± 0.9 mg/kg/min, $p < 0.05$), as well as insulin sensitivity (0.014 ± 0.002 vs 0.026 ± 0.003 , $p < 0.05$). Glucose tolerance did not change significantly, as well as fasting glucose levels. Postprandial total cholesterol, triglycerides, phospholipids and free fatty acids levels were lower after rosiglitazone treatment ($p < 0.05$ for all). Although plasma insulin did not change, hypoglycemic effect of rosiglitazone was evident in postprandial state, with lower plasma glucose levels ($p < 0.05$).

Our data suggest that rosiglitazone improves insulin sensitivity and dyslipidemia in obese insulin resistant dogs. Although glucose tolerance did not change, rosiglitazone was more effective in reducing postprandial plasma glucose.

Keywords: rosiglitazone, insulin resistance, dog, postprandial.

The incidence of type 2 diabetes and associated metabolic syndrome has dramatically increased worldwide over the past two decades [1]. Metabolic syndrome represents a constellation of metabolic abnormalities including glucose intolerance, insulin resistance, central obesity, dyslipidemia and hypertension, all well known as risk factors for cardiovascular disease [2]. Development of new drug treatment for the metabolic syndrome is therefore a tremendous need to prevent cardiovascular disease. In this way, rodent animal models represent an important tool for pharmacological investigations [3]. Dog also represent another non-rodent model that is usually used to test effects and toxicity of lipid-lowering drugs [4,5]. Dog can be easily trained to experimental procedures, such as clamp [6], glucose tolerance tests [7] and kinetic studies [8] to obtain unstressed animal. However, as in rodents, lipid metabolism of healthy dogs is different from humans [8,9] (higher high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and no cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity). Recently, we have developed an obese insulin resistant dog model with similar metabolic disorder seen in humans with the metabolic syndrome [10], mainly high plasma triglycerides (TG) and free fatty acids (FFA), low HDL cholesterol. Therefore, obese insulin resistant dog could be a relevant model to test drugs for the treatment of insulin resistance and dyslipidemia.

In the metabolic syndrome, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligands represent an emergent class of drugs to reduce cardiovascular risks [11]. Among them, thiazolidinediones (TZDs) are oral antihyperglycemic agents that increase insulin sensitivity in peripheral tissues and decrease hepatic glucose production [12]. TZDs are synthetic ligands for PPAR γ which is mainly expressed in adipose tissue and which regulates the transcription of genes involved in adipogenesis, glucose and lipid metabolism [13,14]. Although TZDs are mainly used for their antihyperglycemic effects [15,16], these drugs may also have lipid-lowering effects through an increased clearance of triglycerides-rich

lipoproteins [17]. Among TZDs, rosiglitazone has been shown to improve postprandial TG and FFA metabolism in type 2 diabetes [18]. However, given the action mechanism of TZDs, rosiglitazone treatment has also been associated with body weight increase [19].

We have previously shown that PPAR γ expression is significantly reduced in obese insulin resistant dog [20]. Consequently, thiazolidinedione treatment should improve insulin sensitivity and lipid metabolism in insulin resistant dog. In order to better characterize our model, we therefore tested the effects of 4-week rosiglitazone (2mg/kg/day) treatment on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid metabolism in dyslipidemic obese insulin resistant dog.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diet. Seven obese insulin resistant female beagle dogs (body weight (BW) 16.2 ± 0.7 kg, age 4.4 ± 0.5 years) were studied. They were housed according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of Agriculture and Fisheries. Experimental protocols adhered to European Union guidelines and were approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes. Only healthy animals were enrolled: hematocrit $>38\%$, leukocyte count $<18,000/\text{mm}^3$, good appetite, no medications and normal stools. In order to maintain obesity throughout the experimental period, dogs were fed twice daily (8.30 and 17.00 o'clock) a hyper-energetic diet (32% protein, 20% fat) in combination with sugar-water *ad libitum* (saccharose 100g/L). Dogs received treatment by oral gavage twice daily with vehicle 10% w/v hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (Acros organics, Geel, Belgium) dissolved in water (before treatment) or rosiglitazone (provided by Novonordisk) 2mg/kg/day dissolved in the vehicle solution during 4 weeks drug treatment.

Euglycemic-hyperinsulinemic clamp. Three hours euglycemic-hyperinsulinemic clamp were performed on 17 hours fasted dogs to determine *in vivo* insulin sensitivity, as previously described [6]. Three catheters were acutely placed: (i) cephalic vein for insulin infusion, (ii)

contralateral forelimb for glucose infusion, (iii) jugular vein for blood sampling. Baseline glucose levels from blood samples were measured from $t=-60$ to t_0 every 10 minutes with glucose oxydase method (Glucotrend plus, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). At t_0 , a bolus of insulin (Actrapid, human insulin 40 UI/mL, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) was injected (4 mU/kg), immediately followed by a continuous infusion of insulin (1 mU/kg/min). Glucose (Glucose 20%, Laboratoire Aguettant, Lyon, France) infusion was performed in order to maintain euglycemia. Blood samples were taken at 5-min intervals for one hour and then at 10-min intervals for rapid determination of blood glucose concentration. Blood glucose was maintained at baseline level by adjustment of the glucose infusion rate. Blood samples of 2-3 mL were drawn from the jugular vein for determination of insulin concentrations. These samples were placed in ice-cold heparinized tubes. Plasma was immediately centrifuged at 4°C, 2000g rpm for 10 min and then frozen at -80°C until analysis. Insulin sensitivity (IS) was defined as the mean glucose infusion rate (mg/kg/min) divided by the mean plasma insulin (μ U/ml) of the last 60 minutes of the clamp.

Intravenous Glucose Tolerance Test (IVGTT). One catheter was placed (jugular vein) on 17 hours-fasted dogs for glucose bolus and blood sampling. At $t=0$, a 50% glucose solution (0.6g/kg) was given intravenously as a bolus over 30 seconds. The jugular catheter was flushed twice with 3mL of NaCl 0.9% solution to ensure no residual glucose. Blood samples were taken at -20, -10, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 180 minutes to measure blood glucose (Glucotrend plus, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) and insulin plasma levels. Glucose disappearance constant (K_g , glucose tolerance) was calculated as the slope of the natural log of glucose from 10 to 20 minutes, expressed as the percent of change per minute. Acute insulin response to glucose (AIRg) was calculated as the mean incremental insulin response above basal between 2 and 10 minutes during the IVGTT.

Postprandial lipemia. One catheter was placed (jugular vein) on 17 hours-fasted dogs for blood sampling. At $t=0$, a blood sample (5mL) was collected on ice-cold EDTA tube. Each dog immediately received a single dose of vehicle with or without rosiglitazone by oral gavage and fed its total daily food in up to 15 minutes. Blood samples were taken at $t=0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7$ hours on ice-cold EDTA tubes to measure plasma glucose and lipids.

Lipoprotein separation. Fast protein liquid chromatography (FPLC) analysis was performed at room temperature using two P-500 pumps (1 MPa), a MV-7 place multi-injection with a 200 μ l loop, an ultraviolet (UV) monitor UV-1, a FRAC-100 fraction collector, and a LCC-501 Plus controller. All operations were monitored by absorbance at 280 nm. The system was controlled by FPLC DIRECTOR software (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Orsay, France). Elution was performed in a 1 mM EDTA, 154 mM NaCl, and 0.02% NaN₃ (pH 8.2) buffer. The buffer was filtered through a 0.22 μ m filter (Membrane filters type GV, Duropore[®], Millipore). The column was washed with an aqueous ethanol solution (20%). Two hundred microliters of plasma were injected and elution was performed at a flow of 0.35 ml/min. Approximately 0.35 ml fraction were collected. An entire profile was completed within 105 min. The columns were washed for 50 min at the end of each run. Total cholesterol and triglycerides in odd fractions were determined as described below.

Analytical procedures. Total cholesterol and triglycerides were measured using enzymatic methods (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Non esterified fatty acids (NEFA) and phospholipids were measured with a kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma insulin was measured with RIA kit (Sorin Biomedical, Saluggia, Italy), as well as glucagon (Linco research, St Charles, MO, USA). Others plasma parameters were measured using Hitachi automated methods.

Statistics. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis using StatView 5.0 (SAS institute, Cary, NC) was performed with the Wilcoxon paired test to determine significant

differences between parameters before and after rosiglitazone treatment. A 2-sided *P* value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Clinical and biochemical characteristics. Table 1 shows the characteristics of dogs (n=7) before and after 4-week rosiglitazone treatment at 2mg/kg/day. Body weight was significantly higher after rosiglitazone treatment (15.0 ± 0.6 vs 16.2 ± 0.7 kg, $p<0.05$). Alanine aminotransferase levels were higher (42.1 ± 8.7 vs 69.0 ± 8.4 U/L, $p<0.05$), but below our reference value for liver toxicity (80 U/L). Aspartate aminotransferase did not change. Fasting total cholesterol tended to decrease but not significantly. Triglycerides were significantly lower after treatment (1.3 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 mmol/L, $p<0.05$). Fasting phospholipids, free fatty acids, plasma glucose, insulin and glucagon did not change after treatment.

Euglycemic hyperinsulinemic clamp and intravenous glucose tolerance test. As shown in table 2, infused glucose to maintain basal glycemia during euglycemic hyperinsulinemic clamp was significantly higher with rosiglitazone (9.9 ± 1.1 vs 13.9 ± 0.9 mg/kg/min, $p<0.05$). Accordingly, insulin sensitivity was significantly higher (0.014 ± 0.002 vs 0.026 ± 0.003 , $p<0.05$). Intravenous glucose tolerance tests were used to assess disappearance constant *K_g* (glucose tolerance) and acute insulin response to glucose (AIR_g). As indicated in table 2, glucose tolerance *K_g* tended to decrease but not significantly, as well as AIR_g.

Postprandial lipemia. As shown in figure 1, all plasma lipids and glucose were shifted down after rosiglitazone treatment. The increase of plasma insulin tended to be more regular during the first 3-hour of the study. Areas under the curve calculated from postprandial lipids curves are shown in table 3. Rosiglitazone treatment induced lower total cholesterol, triglycerides,

phospholipids and free fatty acids AUC in postprandial states ($p < 0.05$ for all). Plasma glucose AUC was also lower ($p < 0.05$) but insulin AUC did not change.

Lipoprotein profiles. Lipoprotein profiles were performed with fast protein liquid chromatography (FPLC) analysis. Total cholesterol and triglycerides profiles are presented in figure 2 (phospholipids not shown). Very low density lipoprotein (VLDL) fraction was strongly decreased by rosiglitazone treatment. Low density lipoprotein (LDL) and large high density lipoprotein 1 (HDL₁) were not affected. High density lipoprotein 2 (HDL₂)-cholesterol decreased with drug treatment. As shown in table 4, changes in VLDL and HDL₂ fractions were quantified with AUC calculated from lipoprotein profiles (no significant change in LDL and HDL₁ fractions, data not shown). VLDL-cholesterol, -triglycerides and -phospholipids were lower ($p < 0.05$ for all). There was a significant decrease in HDL₂-cholesterol ($p < 0.05$), but HDL₂-triglycerides and -phospholipids did not change.

DISCUSSION

In the present study, rosiglitazone had no effect on glucose tolerance and fasting glycemia but drug treatment increased significantly insulin sensitivity and glucose infusion rate during euglycemic hyperinsulinemic clamp. Although we only reported lower fasting triglycerides levels ($p < 0.05$), rosiglitazone was very effective in reducing postprandial lipids and plasma glucose.

The insulin-sensitizing actions of thiazolidinedione have been already described in rodent models and humans [21]. Treatment of type 2 diabetes with these drugs lowers blood glucose and serum insulin concentrations through an improvement in insulin-stimulated glucose disposal rates in peripheral tissues [22]. Although we reported improved insulin sensitivity, rosiglitazone had no effect on fasting glucose and insulin plasma levels in our insulin resistant dogs. This lack of effect might be canine-specific. Using alloxan-diabetic

dog, another canine model of insulin resistance, Matsuhisa et al. also reported higher glucose infusion rate during euglycemic hyperinsulinemic clamp with pioglitazone treatment. However, this compound had no effect on fasting plasma glucose and insulin [23]. In our study, plasma glucose values (about 6mM) were lower compared to the fasting plasma glucose values (10-11 mM) reported in alloxan-diabetic dogs [23]. Given that pioglitazone had no effect in hyperglycemic diabetic dogs, it was therefore not surprising that rosiglitazone did not change fasting glucose levels in normoglycemic dogs, even though they were insulin resistant. While they are effective in rat and mice models of type 2 diabetes, PPAR γ agonists may not be effective to ameliorate fasting hyperglycemia in dogs [23, 24]. It should also be noted that no equivalent of human type 2 diabetes have been reported clinically in dogs [25]. Overall, these data suggest that the canine species does not seem to be a relevant model to test hypoglycemic effects of PPAR γ agonists on fasting glucose. Previously, Niwa et al. hypothesized that PPAR γ agonists could improve postprandial plasma glucose levels. However, they did not show any data in supporting this hypothesis [24]. Here, we demonstrate that rosiglitazone is potentially effective in reducing postprandial plasma glucose levels. This indicates that it is somewhat possible to assess the hypoglycemic effect of a thiazolidinedione in dogs with postprandial studies.

Rosiglitazone treatment was also effective in lowering plasma lipids. As shown in lipoprotein profiles, cholesterol, triglycerides and phospholipids were significantly reduced in VLDL fraction. In humans, free fatty acids and triglycerides levels are decreased through a higher lipoprotein lipase (LPL) activity induced by thiazolidinedione treatment [17,18]. Although it was not shown in our study, enhanced LPL activity may occur in rosiglitazone-treated dogs. Such mechanism would also improve plasma lipids in postprandial states. Very recently, the positive effects of rosiglitazone on postprandial free fatty acids and triglycerides levels in humans have been highlighted [18]. The similar results presented here strengthen the

benefic effects of rosiglitazone on postprandial lipids and this also indicates that thiazolidinediones would be useful to prevent cardiovascular disease [11, 26]. However, decreased plasma lipids were associated with body weight increase - an important and frequently reported side effect in humans [22] - because rosiglitazone treatment may stimulate the mechanism of “fatty acids steal” by the adipose tissue [27]. This thiazolidinedione effect on adipocyte metabolism and differentiation has already been suggested in dog [28].

In conclusion, obese insulin resistant dogs would represent an interesting tool to test PPAR γ agonist that would give lipid-lowering and insulin-sensitizing effects without side-effects, e.g., weight gain. Although it is not relevant to evaluate the fasting hypoglycemic effects of such class of drugs, we showed here that postprandial studies were useful in this goal. Because dog has been recently described as relevant to study the biological effects of PPAR α agonists [5], our results support that the canine model is a suitable animal model to test PPAR agonists.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Samuel Ninet, Philippe Bleis, Florent Poirier and Sophie Le Trionnaire for their technical assistance.

REFERENCES

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;**414**:782-7.
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;**365**:1415-28.
3. Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2005;**7**:307-17.
4. Davis HR Jr, Pula KK, Alton KB, Burrier RE, Watkins RW. The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in dogs. *Metabolism* 2001;**50**:1234-41.
5. Nagasawa M, Ide T, Suzuki M, Tsunoda M, Akasaka Y, Okazaki T, Mochizuki T, Murakami K. Pharmacological characterization of a human-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist in dogs. *Biochem Pharmacol* 2004;**67**:2057-69.
6. Bailhache E, Ouguerram K, Gayet C, Krempf M, Siliart B, Magot T, Nguyen P. An insulin-resistant hypertriglyceridaemic normotensive obese dog model: assessment of insulin resistance by the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in combination with the stable isotope technique. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2003;**87**:86-95.

7. Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW. Reduced beta-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am J Physiol* 1999;**277**:E659-67.
8. Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* 2004;**34**:527-34.
9. Mahley RW, Weisgraber KH. Canine lipoproteins and atherosclerosis. I. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ Res* 1974;**35**:713-21.
10. Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, Ouguerram K. Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* 2003;**52**:559-64.
11. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:717-26.
12. van Wijk JP, de Koning EJ, Martens EP, Rabelink TJ. Thiazolidinediones and blood lipids in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**:1744-9.
13. Martin G, Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. PPARgamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. *Atherosclerosis* 1998;**137**:S75-S80.

14. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;**47**:507-14.
15. Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care* 2000;**23**:1605-11.
16. Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, Rappaport EB, Freed MI; Rosiglitazone Clinical Trials Study Group. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:280-8.
17. Nagashima K, Lopez C, Donovan D, Ngai C, Fontanez N, Bensadoun A, Fruchart-Najib J, Holleran S, Cohn JS, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005;**115**:1323-32.
18. van Wijk JP, de Koning EJ, Castro Cabezas M, Rabelink TJ. Rosiglitazone improves postprandial triglyceride and free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;**28**:844-9.
19. Negro R, Mangieri T, Dazzi D, Pezzarossa A, Hassan H. Rosiglitazone effects on blood pressure and metabolic parameters in nondipper diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;**70**:20-5.

20. Leray V, Gayet C, Martin L, Dumon H, Siliart B, Nguyen P. Modulation of uncoupling protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipose tissue in obese insulin-resistant dogs. *J Nutr* 2004;**134**:2154S-2157S.
21. Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* 1999;**16**:179-92.
22. Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet* 2000;**18**;355:1008-10.
23. Matsuhisa M, Shi ZQ, Wan C, Lekas M, Rodgers CD, Giacca A, Kawamori R, Vranic M. The effect of pioglitazone on hepatic glucose uptake measured with indirect and direct methods in alloxan-induced diabetic dogs. *Diabetes* 1997;**46**:224-31.
24. Niwa M, Rashid S, Shum K, Mathoo JM, Chan O, Tchipashvili V, Kawamori R, Vranic M, Giacca A. Effect of JTT-501 on net hepatic glucose balance and peripheral glucose uptake in alloxan-induced diabetic dogs. *Metabolism* 2000;**49**:862-7.
25. Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia* 2005;**48**:1948-56.
26. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005;**54**:2460-70.

27. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 1997;**272**:28210-7.
28. Toseland CD, Campbell S, Francis I, Bugelski PJ, Mehdi N. Comparison of adipose tissue changes following administration of rosiglitazone in the dog and rat. *Diabetes Obes Metab* 2001;**3**:163-70.

Figure legends.

Figure 1. Plasma lipids, glucose and insulin during postprandial studies before (open symbols, dashed lines) and after (close symbols, full lines) rosiglitazone treatment 2mg/kg/day for 4 weeks: (A) total cholesterol ($\circ$) and triglycerides (Δ) levels, (B) phospholipids ($\circ$) and free fatty acids (Δ) levels, and (C) plasma glucose ($\circ$) and insulin (Δ) levels.

Figure 2. Total cholesterol (A) and triglycerides (B) lipoprotein profiles before (dashed lines) and after (full lines) rosiglitazone treatment 2mg/kg/day for 4 weeks.

TABLE 1

Characteristics of the 7 studied animals before and after rosiglitazone treatment 2mg/kg/day for 4 weeks (n=7, *p<0.05)

	before	after
Body weight (kg)	15.0 ± 0.6	16.2 ± 0.7*
ALT (U/L)	42.1 ± 8.7	69.0 ± 8.4*
AST (U/L)	34.6 ± 5.9	32.3 ± 2.8
Total cholesterol (mmol/L)	6.0 ± 0.5	5.0 ± 0.3
Triglycerides (mmol/L)	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.1*
Phospholipids (mmol/L)	4.5 ± 0.4	5.3 ± 0.1
Free fatty acids (mmol/L)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Plasma glucose (mmol/L)	6.5 ± 0.3	6.2 ± 0.2
Insulin (pmol/L)	147 ± 10	133 ± 20
Glucagon (pmol/L)	182 ± 13	350 ± 100

TABLE 2

Euglycemic hyperinsulinemic clamp and intra venous glucose tolerance test parameters before and after rosiglitazone treatment 2mg/kg/day for 4 weeks (n=7, *p<0.05)

Animals	before	after
Infused glucose (mg/kg/min)	9.9 ± 1.1	13.9 ± 0.9*
Insulin sensitivity	0.014 ± 0.002	0.026 ± 0.003*
Kg (%/min)	1.61 ± 0.14	1.28 ± 0.05
AIRg (pM)	434 ± 36	364 ± 40

TABLE 3

Total cholesterol, triglycerides, phospholipids, free fatty acids, glucose and insulin area under the curve calculated from postprandial studies, before and after rosiglitazone treatment 2mg/kg/day for 4 weeks (n=7, *p<0.05)

AUC	before	after
cholesterol	43.8 ± 2.8	35.9 ± 2.5*
triglycerides	21.8 ± 3.9	8.0 ± 0.7*
phospholipids	40.3 ± 3.2	29.0 ± 3.2*
FFA	6.5 ± 1.9	1.8 ± 0.2*
glucose	50.6 ± 2.0	42.3 ± 1.1*
insulin	2586 ± 334	2754 ± 368

TABLE 4

Total cholesterol, triglycerides, phospholipids area under the curve calculated from lipoprotein profiles (n=7, *p<0.05)

AUC	before	after
VLDL-cholesterol	0.10 ± 0.02	$0.05 \pm 0.01^*$
VLDL-triglycerides	0.73 ± 0.12	$0.17 \pm 0.03^*$
VLDL-phospholipids	0.28 ± 0.05	$0.13 \pm 0.02^*$
HDL2-cholesterol	3.31 ± 0.31	$2.72 \pm 0.22^*$
HDL2-triglycerides	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02
HDL2-phospholipids	5.54 ± 0.55	4.41 ± 0.76

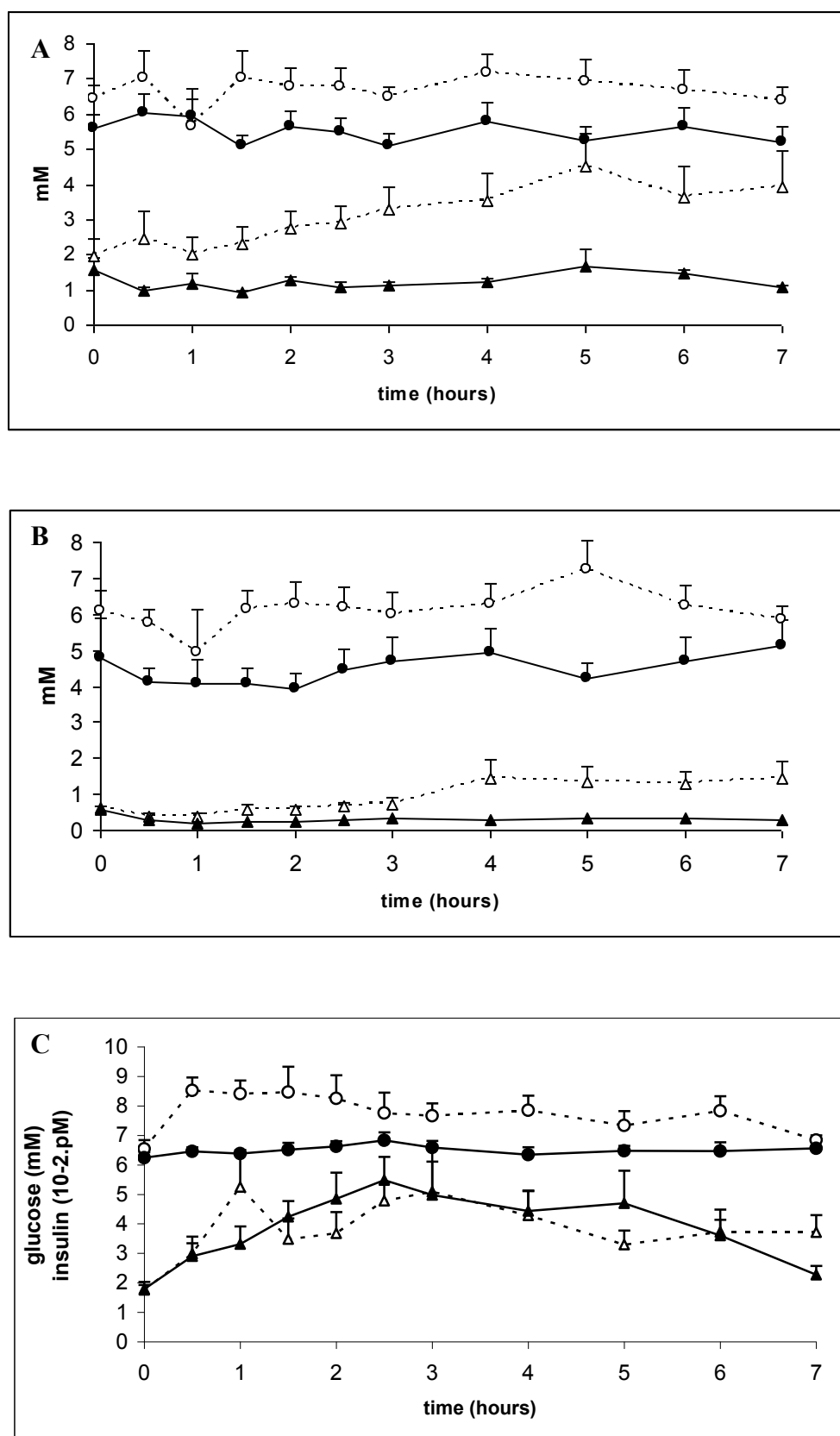


Figure 1.

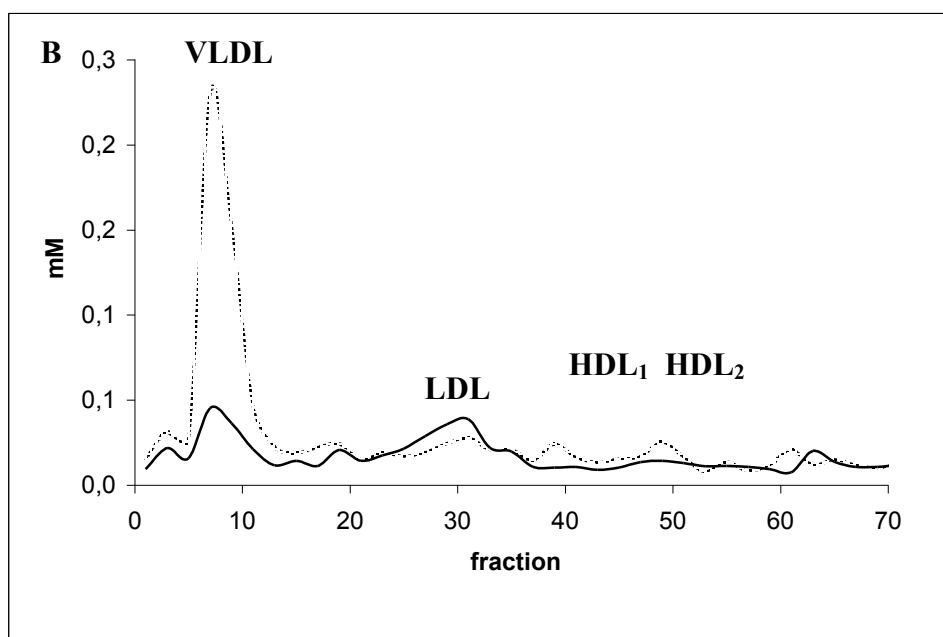
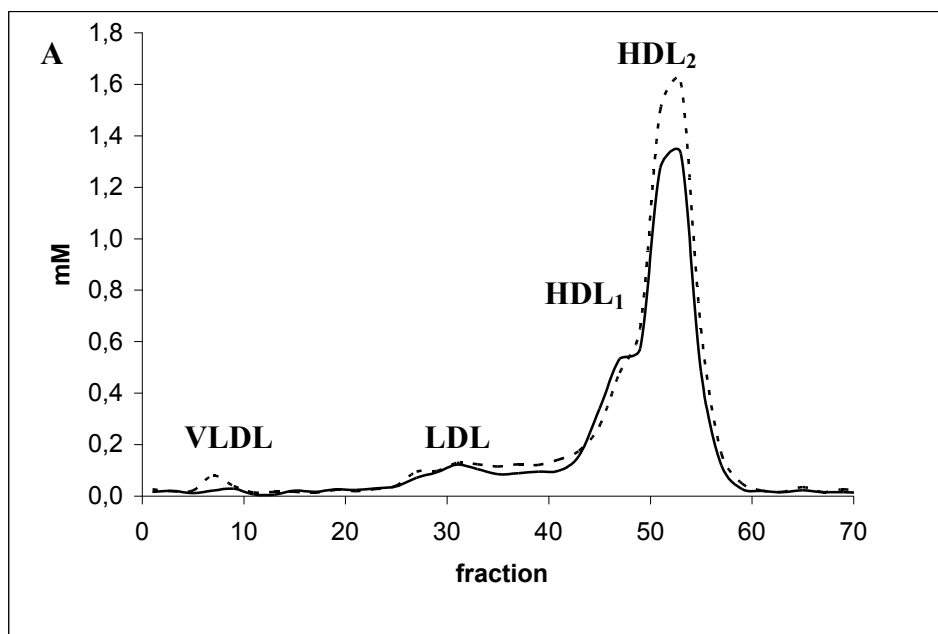


Figure 2.

V.3.3 Discussion

La présente étude montre que les effets de la rosiglitazone sur le chien obèse insulino-résistant sont relativement similaires à ceux décrits chez l'homme : amélioration de la sensibilité à l'insuline, diminution de la triglycéridémie (triglycérides des VLDL) et des taux d'acides gras libres. Néanmoins, dans la mesure où le chien insulino-résistant n'est pas hyperglycémique, nous n'avons pas pu mesurer d'effet hypoglycémiant. Cependant, la période postprandiale semble être une bonne alternative pour remédier à ce problème.

Les effets hypolipémiants de la rosiglitazone ont été également mesurés durant cette période, comme le montre une étude récente sur l'homme (van Wijk et al., 2005). Pour confirmer l'effet bénéfique de la rosiglitazone sur la sensibilité à l'insuline et les effets hypoglycémians qui en découlent, des mesures de l'activité LPL et des études cinétiques seraient nécessaires. La baisse des taux de triglycérides résulterait d'une augmentation de l'activité LPL et d'une baisse de la production d'apo C-III (Nagashima et al., 2005) chez l'homme. Les effets hypolipémiants de la rosiglitazone ont pour contre partie une prise de poids significative, probablement induite par la différenciation adipocytaire chez les chiens traités, un effet secondaire également décrit chez l'homme (Negro et al., 2005).

Comme d'autres études le suggéraient déjà (Niwa et al., 2000), ces résultats confirment l'intérêt du modèle canin pour tester l'effet des agonistes PPAR γ . Le chien conviendrait également pour l'évaluation des agonistes PPAR α . En effet, comparé à la souris et au rat, la séquence d'acides aminés du PPAR α canin est la plus proche de celle de l'homme (95% d'homologie). Le chien est donc le modèle le plus adapté pour tester et prédire les effets des agonistes PPAR α chez l'homme (Nagasawa et al., 2004). Nous avons en outre démontré l'efficacité du fénofibrate sur notre modèle d'insulino-résistance (Serisier et al., sous presse), avec des effets significatifs sur les taux de triglycérides, cholestérol, phospholipides et acides gras libres. Vu l'ensemble de ces données, l'évaluation des doubles agonistes PPAR α /PPAR γ sur notre modèle serait pertinente. Ce type de molécule a d'ailleurs été récemment testée sur le chien sain (Shi et al., 2005).

VI. ETUDE DU TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL

VI.1 Effets de l'insulinorésistance sur le transport inverse du cholestérol

VI.1.1 Introduction

Dans le transport inverse du cholestérol, la capture sélective du HDL-cholestérol apparaît comme un mécanisme potentiellement anti-athérogène. En effet, le cholestérol des HDL capté par SR-BI est directement sécrété dans la bile (Ji et al., 1999; Zhang et al., 2005). Néanmoins, les effets de l'insulinorésistance sur la capture sélective du HDL-cholestérol étant mal connus, il était nécessaire d'étudier ce mécanisme dans ces conditions.

Chez le chien sain, nous avons développé un protocole d'étude de la capture sélective des esters de cholestérol des HDL (HDL-CE). Grâce à une perfusion simultanée de $^2\text{H}_3$ -leucine, marqueur de l'apo A-I, et de ^{13}C -acétate, qui entre dans la biosynthèse du cholestérol, il nous a été possible de quantifier l'importance de la capture sélective des HDL-CE (Ouguerram et al., 2004). En effet, la capture sélective des HDL-CE représente 60% du catabolisme total des esters de cholestérol. Comparé à des espèces comme le rat, la souris, le lapin ou l'homme, le chien est l'espèce où la capture sélective des HDL-CE est la voie de retour la plus importante (Ouguerram et al., 2004).

A partir de ces données, notre but était donc de déterminer les effets de l'insulinorésistance sur le mécanisme de capture sélective chez le chien obèse insulinorésistant.

VI.1.2 Article n°4

Metabolism of High Density Lipoprotein apolipoprotein A-I and Cholesteryl Esters in Insulin Resistant Dogs: A Stable Isotope Study.

François Briand, Edwige Bailhache, Patrick Nguyen, Michel Krempf, Thierry Magot, Khadija Ouguerram.

Diabetes Obes Metab, sous presse.

Metabolism of High Density Lipoprotein Apolipoprotein A-I and Cholesteryl Ester in Insulin Resistant Dog: A Stable Isotope Study.

F.Briand et al

Running head: Reverse cholesterol transport in dog.

François BRIAND^{1,2,*}, Edwige BAILHACHE^{1,2,*}, Patrick NGUYEN², Michel KREMPF¹, Thierry MAGOT¹, Khadija OUGUERRAM¹

Centre de Recherche en Nutrition Humaine,

1: INSERM U539, CHU Nantes, France

2: USC INRA de Nutrition et Endocrinologie, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, France

*equal contribution

Word count of the complete text: 1098

Corresponding Author:

Khadija OUGUERRAM

Centre de Recherche en Nutrition Humaine

INSERM U539, CHU Nantes

1 place Alexis Ricordeau

44093 Nantes Cedex 01, France

Tel : (33)240087535

Fax : (33)240087544

Khadija.Ouguerram@univ-nantes.fr

Aim In reverse cholesterol transport (RCT), hepatic Scavenger Receptor class B type I (SR-BI) plays an important role by mediating the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester (HDL-CE). However, little is known about this anti-atherogenic mechanism in insulin resistance. HDL-CE selective uptake represents the main process for HDL-CE turnover in dog, a species lacking cholesteryl ester transfer protein activity. We therefore investigate the effects of diet induced insulin resistance on RCT.

Methods Five beagle dogs, in healthy and insulin resistant states, underwent a primed constant infusion of [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetate and [5,5,5- $^2\text{H}_3$]leucine, as labelled precursors of CE and apolipoprotein (apo) A-I, respectively. Data were analyzed using modelling methods.

Results HDL-apo A-I concentration did not change in insulin resistant state but apo A-I absolute production rate (APR) and fractional catabolic rate (FCR) were both higher (2.2 fold and 2.4 fold, respectively, $p < 0.05$). HDL-CE levels were lower (1.2 fold, $p < 0.05$). HDL-CE APR and FCR were both lower (2.3 fold and 2 fold, respectively, $p < 0.05$), as well as selective uptake (2.6 fold, $p < 0.05$).

Conclusion Lower HDL-CE selective uptake suggests that RCT is impaired in obese insulin resistant dog.

Key words- Insulin resistance, apo A-I, SR-BI, CETP, dog.

The inverse correlation between high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration and cardiovascular disease (CVD) is well recognized [1]. As a consequence, therapeutic improvement of reverse cholesterol transport (RCT) -cholesterol efflux from peripheral cells to the liver- and HDL-C levels represents a main target to prevent CVD. An important pathway in RCT is the selective uptake of HDL-cholesteryl esters (CE). This mechanism is known to be antiatherogenic because hepatic SR-BI activity enhances the direct secretion of cholesterol into bile [2]. Although insulin resistance has been often characterized by a decrease of HDL-C levels [3], further investigations are still needed to establish the effects of insulin resistance on RCT and SR-BI mediated HDL-CE selective uptake. Using stable isotopes, we have previously described a method to study both *in vivo* cholesteryl esters and apolipoprotein metabolism in humans [4]. Using this protocol, we have recently demonstrated that dog is a species in which selective uptake via SR-BI represents the largest part of HDL-CE turnover [5] that goes with a lack of CETP activity in dog, both *in vitro* and *in vivo* [6]. We have also described a dog model of obesity-associated insulin resistance [7]. This animal model would be useful to study the effects of insulin resistance on HDL-C, apo A-I metabolism and selective uptake of CE. In the present report, kinetic studies were conducted in dogs, in healthy and insulin resistant states, using a primed constant infusion of $[1,2^{13}\text{C}_2]\text{acetate}$ and $[5,5,5\text{-}^2\text{H}_3]\text{leucine}$, as labelled precursors of CE and apo A-I, respectively. Kinetic parameters for apo A-I and HDL-CE were subsequently estimated to assess HDL-CE selective uptake, as an indicator of RCT efficiency.

METHODS

Five healthy adult male beagle dogs (body weight (BW): 11.9 ± 1.0 kg, age 4.1 ± 0.9 years) were studied. Experimental protocols adhered to European Union guidelines and were approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes. Obesity was induced with a hyperenergetic diet as previously described [7]. Insulin

sensitivity was assessed, as previously described [8], by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique in conscious dogs, before weight gain and when BW gain was at least 20% of initial BW. Kinetic studies were performed as previously described [5] using a 8-hour constant infusion of [1,2-¹³C₂] acetate and [5,5,5-²H₃]leucine, as labelled precursors of CE and apolipoprotein (apo) A-I. Venous blood samples were withdrawn in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Venoject, Paris, France) at 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 24, 26h. Sodium azide (inhibitor of bacterial growth), protease inhibitor (Interchim, Montluçon, France) and 5,5-dithio-bis-nitro benzoate (DTNB), an LCAT inhibitor, were added to plasma samples. HDL ApoA-I and plasma leucine were analyzed for isotopic enrichment of leucine using gas chromatography coupled-mass spectrometry (GC-MS) [5]. Analysis of cholesterol and measurement of ¹³C enrichments using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) were performed as previously described [5]. Kinetic analysis was performed with SAAMII program (SAAM Institute, Seattle, WA), using one-compartment model for both HDL-apo A-I and HDL-CE models, as previously described [5]. Data are reported as mean ± SEM. Statistical analysis using StatView 5.0 (SAS institute, Cary, NC) was performed with the Wilcoxon paired test to determine significant differences between parameters for dogs in healthy and insulin resistant states. A 2-sided *P* value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Table 1 shows the characteristics of dogs before and after weight gain. Body weight increased 1.5-fold (*p*<0.05) in 28 ± 2.5 weeks (+ 1.3% per week). Obese dogs showed significant elevated fasting insulin concentrations (2.1-fold, *p*<0.05) with no change in plasma glucose. Glucose infusion during euglycemic hyperinsulinemic clamp was significantly lower in obese dogs (1.9-fold, *p*<0.05) and confirmed the insulin resistance state. Obese insulin resistant dogs had significantly higher triglycerides (3.3-fold, *p*<0.05) and non-

esterified fatty acids (1.6-fold, $p<0.05$), higher HDL-TG (9.2-fold, $p<0.05$) but lower HDL-C (1.1-fold, $p<0.05$) compared with the lean state. CETP activity was not detectable at any state. The kinetic parameters are presented in Table 2. Apo A-I APR and FCR were both higher (2.2-fold and 2.4-fold, respectively, $p<0.05$). HDL apo A-I levels did not change. HDL-CE levels were lower in insulin resistant dogs (1.2-fold, $p<0.05$). Cholesterol esterification (k_{LCAT}) was significantly lower (2.2-fold, $p<0.05$). HDL-CE APR and FCR were significantly lower (2.3-fold and 2-fold respectively, $p<0.05$). The CE selective uptake was also lower in insulin resistant dog (2.6-fold, $p<0.05$).

DISCUSSION

Although HDL-apo A-I kinetics are widely used to study HDL metabolism in insulin resistance [9], our data suggest that this method would not be sufficient to assess RCT efficiency. Because important differences in organ uptake and fractional uptake rate have been observed between HDL-apo A-I and HDL-CE [10], HDL-CE kinetic study appears critical to investigate RCT. In the present study, HDL-CE concentration was significantly reduced in insulin resistant dog. This was related to a significantly lower HDL-CE APR through LCAT cholesterol flux. Although we did not measure fatty acids composition, other mechanisms such as ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) destabilization by unsaturated fatty acids [11] could be involved in the decreased HDL-CE production. Simultaneous HDL-CE and HDL-apo A-I kinetic studies allowed us to assess the selective uptake of HDL-CE and this antiatherogenic mechanism was dramatically reduced in insulin resistant dog. To our knowledge, the effects of insulin resistance on SR-BI mediated selective uptake have never been described. One might speculate that triglycerides-enrichment of HDL may have contributed to the decrease of HDL-CE selective uptake because elevated triglyceride content reduce the capacity of HDL to deliver CE via SR-BI [12]. As well, TG-

enrichment of HDL could be related to the higher apo A-I FCR observed, because triglycerides-enriched HDL is a better substrate for hydrolysis by hepatic lipase [13]. However, effects of TG-enrichment on HDL metabolism have been described in human studies and are related to a higher CETP activity with increased pool of VLDL-TG [6]. Given that CETP activity is not detectable in healthy and insulin resistant dogs, investigations are needed to demonstrate the mechanism of TG-enrichment and its effect on HDL metabolism in dog.

Further studies are also needed to investigate how apo A-I production increased in insulin resistant dog. This mechanism kept HDL-apo A-I concentration unchanged. Such a result suggests that it is not possible to conclude for any impairment of RCT with studies limited to apo A-I kinetic data. It is therefore necessary to conduct both HDL-apo A-I and HDL-CE kinetics to clearly investigate the effects of the metabolic syndrome on RCT. Using this method, lower HDL-CE selective uptake showed that reverse cholesterol transport was strongly impaired in insulin resistant dog. This animal model could be used for further research on HDL-CE selective uptake modulation by nutritional or pharmacological factors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Pascale Maugère and Samuel Ninet for their technical assistance.

REFERENCES

1. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;**62**:707-14.
2. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL *et al.* Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 1999;**274**:33398-402.
3. Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem* 2003;**36**:421-9.
4. Ouguerram K, Krempf M, Maugeais C, Maugere P, Darmaun D, Magot T. A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism* 2002;**51**:5-11.
5. Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E *et al.* Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity. An in vivo approach using stable isotopes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;**138**:339-45.

6. Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* 2004;**34**:527-34.
7. Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, Ouguerram K. Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* 2003;**52**:559-64.
8. Bailhache E, Ouguerram K, Gayet C, Krempf M, Siliart B, Magot T *et al.* An insulin-resistant hypertriglyceridaemic normotensive obese dog model: assessment of insulin resistance by the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in combination with the stable isotope technique. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2003;**87**:86-95.
9. Ooi EM, Watts GF, Farvid MS, Chan DC, Allen MC, Zilko SR, Barrett PH. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in obesity. *Obes Res* 2005;**13**:1008-16.
10. Glass C, Pittman RC, Civen M, Steinberg D. Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 1985;**260**:744-50.
11. Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. *J Biol Chem* 2005;**280**:35896-903.
12. Greene DJ, Skeggs JW, Morton RE. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J Biol Chem* 2001;**276**:4804-11.

13. Beisiegel U. New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996;**124**:1-8.

TABLE 1. Clinical and biochemical characteristics of the 5 studied animals

Animals	Healthy	Obese
Weight (kg)	11.9 ± 1.0	18.1 ± 2.0*
Fasting blood glucose (mg/dL)	87 ± 2	89 ± 2
Fasting insulin (μU/mL)	10 ± 2	21 ± 4*
Glucose infusion (mg/kg/min)	29.9 ± 2.4	15.6 ± 1.3*
Fasting triglycerides (mmol/L)	0.23 ± 0.05	0.76 ± 0.33*
Total cholesterol (mmol/L)	5.38 ± 0.30	4.96 ± 0.38
LDL-cholesterol (mmol/L)	0.48 ± 0.12	0.54 ± 0.19
HDL-cholesterol (mmol/L)	4.88 ± 0.22	4.29 ± 0.24*
HDL-triglycerides (mmol/L)	0.027 ± 0.016	0.249 ± 0.189*
NEFA (mmol/L)	0.947 ± 0.117	1.494 ± 0.121*
CETP activity (nmol/h/μL)	ND	ND

Data are means ± SEM (*P<0.05, ND not detectable)

TABLE 2. Kinetic data of HDL apolipoprotein A-I and HDL-CE in healthy (1) and obese insulin resistant (2) dogs (*p<0.05)

	HDL-apoA-I (g/L)	Apo A-I APR (mg/kg/h)	Apo A-I FCR (h-1)	HDL-CE (mmol/L)	kLCAT (h-1)	HDL-CE APR (μmol/kg/h)	HDL-CE FCR (h-1)	Selective uptake (h-1)
I-1	3.04	0.40	0.003	4.14	0.189	15.20	0.081	0.079
II-1	2.79	0.09	0.001	4.05	0.308	19.79	0.108	0.108
III-1	2.53	0.26	0.002	3.16	0.303	20.15	0.141	0.139
IV-1	2.95	1.56	0.011	3.51	0.168	11.72	0.074	0.062
V-1	2.31	0.76	0.007	3.18	0.147	9.04	0.063	0.056
Mean ± SEM	2.72 ± 0.13	0.61 ± 0.26	0.005 ± 0.002	3.61 ± 0.20	0.223 ± 0.034	15.18 ± 2.18	0.094 ± 0.014	0.089 ± 0.015
I-2	3.62	0.77	0.004	3.78	0.115	9.49	0.056	0.051
II-2	3.69	0.36	0.002	3.24	0.138	9.62	0.066	0.064
III-2	2.84	0.86	0.006	2.50	0.093	4.57	0.040	0.034
IV-2	2.27	3.27	0.032	3.20	0.129	6.93	0.048	0.016
V-2	2.35	1.42	0.013	2.87	0.031	2.40	0.019	0.005
Mean ± SEM	2.96 ± 0.30	1.33 ± 0.51*	0.012 ± 0.005*	3.12 ± 0.21*	0.101 ± 0.019*	6.60 ± 1.40*	0.046 ± 0.008*	0.034 ± 0.011*

VI.1.3 Discussion

Grâce à l'utilisation d'un marquage simultané de l'apo A-I et du cholestérol, nous avons pu mettre en évidence une altération du transport inverse du cholestérol chez le chien. La plupart des études cinétiques sont basés sur un simple marquage de l'apo A-I, qui sert alors d'indicateur sur de possibles altérations du transport inverse du cholestérol. Or notre étude montre que cette méthode est relativement limitée pour quantifier le transport inverse du cholestérol. Les paramètres cinétiques de l'apo A-I n'indiquent pas d'effets délétères de l'insulinorésistance sur les taux d'apo A-I, puisque l'hypercatabolisme est compensé par une augmentation de la production. Avec ces seuls résultats, il n'aurait pas été possible de conclure à une éventuelle altération du transport inverse du cholestérol.

Le marquage du cholestérol lui-même serait donc la meilleure méthode pour étudier ce processus. En effet, le marquage du cholestérol par le ^{13}C -acétate a permis de quantifier la capture sélective des HDL-CE, qui diminue significativement avec l'insulinorésistance.

Les mécanismes impliqués dans cette diminution sont pour l'instant inconnus, bien que l'on puisse évoquer le rôle possible de l'enrichissement des HDL en triglycérides (Greene et al., 2001). L'origine de l'enrichissement des HDL en triglycérides n'est pas connue. Comme d'autres (Tsutsumi et al., 2001), nous avons mis en évidence l'absence d'activité CETP *in vivo* et *in vitro* chez le chien sain (Bailhache et al., 2004). Cette absence semble perdurer en état d'insulinorésistance, ce qui écarte un rôle possible de la CETP dans l'enrichissement en triglycérides des HDL, comme on a pu le décrire chez l'homme. Une étude cinétique des triglycérides pourrait apporter des réponses, sachant qu'un effet hypertriglycéridémiant du régime est également envisageable. En effet, nous n'avons pas pu reproduire ce mécanisme d'enrichissement en triglycérides des HDL au cours des autres études (voir article n°2 et n°3).

La baisse de capture sélective des esters de cholestérol pourrait aussi être liée à une baisse d'expression hépatique du récepteur SR-BI, même si à ce jour aucune étude sur l'insulinorésistance et l'expression du récepteur n'est disponible. Bien que nous utilisions désormais un anti-corps anti-SR-BI (voir article n°1 et n°5), nous n'avons malheureusement pas disposé d'échantillon de tissu hépatique dans cette étude pour évaluer les effets de l'insulinorésistance sur l'expression de la protéine.

L'activation de la capture sélective des esters de cholestérol des HDL contribuerait à éliminer l'excès de cholestérol des cellules périphériques et à prévenir les maladies cardiovasculaires. La présente étude montre que le chien obèse insulino-résistant est un modèle de choix tant pour l'étude de ce mécanisme que pour celle de sa modulation pharmacologique et nutritionnelle.

VI.2 Effets de l'atorvastatine sur le métabolisme de l'apo A-I des HDL

VI.2.1 Introduction

Outre l'insulinorésistance, la modulation pharmacologique du métabolisme des HDL représentait une deuxième démarche pour étudier le transport inverse du cholestérol chez le chien.

Chez l'homme (Jones et al., 1998; Wierzbicki et al., 1999) et chez le lapin (Rashid et al., 2002), qui présentent tous deux une activité CETP, l'atorvastatine, à forte dose, diminue les concentrations en HDL-cholestérol. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans cette réduction des taux de HDL-cholestérol sont à ce jour peu détaillés. Déjà largement utilisée dans le traitement des hyperlipémies, l'atorvastatine pourrait également être combinée avec des inhibiteurs de CETP. Une étude récente a d'ailleurs montré l'efficacité de cette combinaison sur la cholestérolémie et les taux de HDL-cholestérol (Brousseau et al., 2004). Cependant les effets de cette combinaison sur le transport inverse du cholestérol ne sont pas clairement établis, même si le dosage des stérols fécaux n'indique pas de changement significatif (Brousseau et al., 2005).

Pour tenter d'apporter quelques éléments de réponses à ces questions, nous avons donc étudié les effets d'une forte dose d'atorvastatine (5mg/kg/jour) sur le métabolisme de l'apo A-I chez le chien sain, qui n'a pas d'activité CETP. La dose de 5mg/kg/jour a été choisie dans le but d'obtenir des effets très significatifs sur le HDL-cholestérol et de les comparer à une étude cinétique précédemment menée chez le lapin avec la même dose.

VI.2.2 Article n°5

Effects of Atorvastatin on High Density Lipoprotein Apolipoprotein A-I Metabolism in Dogs.

François Briand, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen, Khadija Ouguerram.

Eur J Clin Invest, 2006;36 :224-30.

Effects of atorvastatin on high density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism in dogs.

Running head: atorvastatin in dogs.

F. Briand^{1,2}, T. Magot¹, M. Krempf¹, P. Nguyen² and K. Ouguerram¹

Centre de Recherche en Nutrition Humaine,

1: INSERM U539, CHU Nantes, France

2: USC INRA de Nutrition et Endocrinologie, Ecole nationale vétérinaire de Nantes, France

Word count of the complete text: 4557

Corresponding Author:

Khadija OUGUERRAM, PhD.

Centre de Recherche en Nutrition Humaine

INSERM U539, CHU Nantes

1 place Alexis Ricordeau

44093 Nantes Cedex 01, France

Tel : (33)240087535

Fax : (33)240087544

Khadija.Ouguerram@univ-nantes.fr

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Samuel Ninet and Philippe Bleis for their excellent technical assistance.

Abstract

Background The mechanisms involved in the decline of high density lipoprotein (HDL) levels at higher dose of atorvastatin have not yet been elucidated. We investigated the effects of atorvastatin on HDL-apolipoprotein (apo) A-I metabolism in dogs, a species lacking cholesteryl ester transfer protein activity.

Materials and methods Seven ovariectomized normolipidemic female beagle dogs underwent a primed constant infusion of [5,5,5-²H₃] leucine to determine HDL-apo A-I kinetics before and after atorvastatin treatment (5mg/kg/d for 6 weeks). Plasma lipoprotein profiles, activity of HDL-modifying enzymes involved in reverse cholesterol transport and hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) expression were also studied.

Results Atorvastatin treatment decreased HDL-cholesterol levels (3.56 ± 0.24 vs 2.64 ± 0.15 mmol/l, $p < 0.05$). HDL-triglycerides were not affected. HDL-phospholipids levels were decreased (4.28 ± 0.13 vs 3.29 ± 0.13 mmol/l, $p < 0.05$) as well as phospholipids transfer protein (PLTP) activity (0.83 ± 0.05 vs 0.60 ± 0.05 pmol/ μ l/min, $p < 0.05$). Activity of lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT), hepatic lipase (HL) and SR-BI expression did not change. HDL-apo A-I absolute production rate (APR) was higher after treatment (2 fold, $p < 0.05$) as well as fractional catabolic rate (FCR) (3 fold, $p < 0.05$). This resulted in lower HDL-apo A-I levels (2.36 ± 0.03 vs 1.55 ± 0.04 g/l, $p < 0.05$). Plasma lipoprotein profiles showed a decrease in large HDL₁ levels, with lower apo A-I and higher apo E levels in this subfraction.

Conclusions Although high dose of atorvastatin upregulated HDL-apo A-I production, this drug also increased HDL-apo A-I FCR in dogs. This effect could be explained by a higher uptake of apo E-enriched HDL₁ by hepatic lipoprotein receptors.

Key words: lipoprotein, apo A-I, atorvastatin, CETP, kinetics, dog.

Statins reduce the risk of coronary artery disease (CAD) by lowering pro-atherogenic low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) [1] but are less effective in raising anti-atherogenic high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels [2]. Statins generally increase HDL-C concentration by 5-10% in humans [3] through an up-regulation of apolipoprotein (apo) A-I production [4,5]. In the case of atorvastatin, however, numerous kinetic studies have shown a lack of effects on apo A-I metabolism [6-8]. Moreover, the HDL-raising effect seems to be lost at the highest recommended dose of 80mg [3,9] but little is known about the metabolic basis of HDL-C decrease at higher dose of atorvastatin.

In the New Zealand White rabbit, a species that expresses cholesteryl ester transfer protein (CETP), atorvastatin at 5mg/kg/d induced a higher HDL-apo A-I catabolism that decreased apo A-I levels [10]. In this study, HDL-apo A-I catabolism was related to an unexpected HDL-TG enrichment that increases HDL-apo A-I catabolism [11]. However, the mechanism involved in HDL-TG enrichment remains unclear because atorvastatin lowers CETP activity dose-dependently [8,12,13] which should in turn decrease HDL-triglycerides.

Unlike rabbit and human, dog is lacking CETP activity [14] and has high HDL-C levels [15]. The aim of the present study was therefore to investigate the effects of atorvastatin at 5mg/kg/d on HDL metabolism when CETP activity is lacking. We performed kinetic studies of endogenously labelled HDL-apo A-I in dogs before and after treatment. Because hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) has a potent influence on HDL cholesterol levels [16], expression of this HDL receptor was also studied. Moreover, we assessed the activity of HDL-modifying enzymes that play a key role in reverse cholesterol transport: (i) lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) mediates the esterification of HDL-free cholesterol, (ii) hepatic lipase (HL) hydrolyses HDL-triglycerides and HDL-phospholipids, (iii) phospholipids transfer protein (PLTP) transfers phospholipids from very low density lipoprotein (VLDL) to HDL.

Materials and methods

Animals and diet. Seven ovariectomized normolipidemic female beagle dogs, mean body weight 11.1 ± 0.03 kg, 3-year old, were studied. Ovariectomization was performed one year before the study to avoid any changes in plasma lipoprotein during the oestrous cycle [17]. Dogs were housed according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of Agriculture and Fisheries. Experimental protocols adhered to European Union guidelines and were approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes. Only healthy animals were enrolled: hematocrit $>38\%$, leukocyte count $<18,000/\text{mm}^3$, good appetite, no medications and normal stools. Healthy dogs consumed in a single meal a dry commercial food (27% crude protein, 13% ether extract, 3730 kcal metabolizable energy/kg, on a dry matter basis) and were fed according to the National Research Council recommendation (132 kcal metabolizable energy/kg BW^{0.75}). Atorvastatin (TAHOR®, Pfizer, Paris, France) was bought in a local pharmacy and administered at 5mg/kg/day by daily oral gavage for 6 weeks. This dose was well tolerated by dogs during treatment and no sign of toxicity was observed.

Experimental protocol. Animals had their last meal 20 h before the beginning of the experiment, and were not fed during the entire protocol (26 h). Glycaemia was controlled during the entire study with glucose oxydase method (Glucotrend plus, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Two intravenous catheters were inserted: one (Vasocan Braunüle, 20G 1 1/4", B.Braun, Melsungen, Germany) in the cephalic vein of a forelimb for infusion of tracers and a second one (Vygon 20G 8cm, Ecouen, France) in a jugular vein for collection of blood samples. Each animal received intravenously a bolus of $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ of [5,5,5-²H₃]leucine (as endogenous marker of apo A-I, 99.8 Atom%; Mass Trace, Woburn, Mass., USA), immediately followed by a constant tracer infusion ($10 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) for 8 h. Stable isotope tracers were weighed on a high precision scale and dissolved in known volumes of

sterile 0.9% NaCl. Solutions were prepared just before study, sterilized by passing through a 0.22 μm filter, stored in sterile sealed containers. Venous blood samples were drawn in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Venoject, Paris, France) at hours 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 24 and 26. Plasma was immediately separated by centrifugation at 5000 rpm for 10 min at 4°C. Sodium azide, an inhibitor of bacterial growth, and Pefabloc SC (Interchim, Montluçon, France), a protease inhibitor, were added to plasma samples stored at -80°C until analysis.

Liver biopsies. A liver tissue sample was surgically excised after a short, general anesthesia with IMALGENE®1000 (MERIAL, Lyon, France), administered intravenously. The biopsy sample was rinsed with ice-cold 0.9% NaCl, split in aliquots and immediately frozen in liquid nitrogen. Liver samples were then stored at -80°C until analysis.

Analytical procedures. Plasma VLDL was isolated by standard ultracentrifugation methods [18] using a fixed angle rotor at 40 000 rpm for 22 h at 4°C (Himac CP 70, Hitachi, Hialeah, FL). Four-ml plasma samples were overlaid with 2.5 ml of 0.9% NaCl containing 2 mM EDTA (density 1.006 g/ml) prior to centrifugation. The VLDL fraction was removed from the top 1.5 mL. Because HDL is present in the density range of LDL in dogs [15], a precipitation method was used [19]. LDL was precipitated from the infranatant by the addition of 5 ml of 101 mM heparin manganese chloride, followed by incubation for 30 min and then centrifuged at 4000 rpm, 4°C for 30 min. The LDL precipitate was resolubilized with 0.25 mL 0.5 M sodium citrate and 1 mL 0.15 M sodium chloride. Plasma without VLDL and LDL was then adjusted at $d=1.21\text{g/mL}$ and was ultracentrifuged (40 000 rpm, 22 h at 4°C). HDL fraction was removed from the top 1.5 mL and then dialyzed overnight at 4°C against sodium chloride/azide (8.77 g sodium chloride, 0.2 g sodium azide, 0.5 g Na_2EDTA in 1 liter, pH 7.3). ApoA-I and plasma leucine were analyzed for isotopic enrichment of leucine using gas chromatography coupled-mass spectrometry (GC-MS), as previously described [20]. Apo A-I

concentration was determined by immunoturbidimetry (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Total cholesterol, triglycerides and phospholipids were measured using enzymatic methods (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Non esterified fatty acids (NEFA) and free cholesterol were measured with a kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany). Total cholesterol in liver homogenate was measured after lipid extraction with diisopropylether-butanol (6v/4v). PLTP activity was determined with a commercial kit (Cardiovascular Targets, New York, NY), as well as LCAT activity (RoarBiomedical, New York, NY).

Hepatic lipase activity. Pre and post-heparin blood samples were drawn into ice-cold heparin tubes before and 10 minutes after iv injection of 100UI heparin/kg at the end of the kinetic protocol. Plasma was separated at 4°C and frozen at -80°C until assayed. HL activity was determined using a commercial kit (Progen Biotechnic, Heidelberg, Germany).

Immunoblot analysis. Liver pieces were homogenized in 1x phosphate-buffered saline containing 0.25% Na-deoxycholate, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The supernatant was collected and 50 µg of liver protein were resolved on Nu-PAGE® 4–12% Bis-Tris gels in MES-SDS buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under reducing conditions. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay kit (Interchim, Montluçon, France). Proteins were transferred onto a Protran nitrocellulose membrane (Schleicher and Shuell, Dassel, Germany), probed with polyclonal rabbit anti-scavenger receptor class B type I (SR-BI; Novus, Littleton, CO) using Vectastain PK6101 (AbCys, Paris, France).

Fast protein liquid chromatography. Fast protein liquid chromatography (FPLC) plasma analysis was performed at room temperature using two P-500 pumps (1 MPa), a MV-7 place multi-injection with a 200 µl loop, an ultraviolet (UV) monitor UV-1, a FRAC-100 fraction collector, and a LCC-501 Plus controller. All operations were monitored by absorbance at 280 nm. The system was controlled by FPLC DIRECTOR software (Amersham Pharmacia

Biotech Inc., Orsay, France). Elution was performed in a 1 mM EDTA, 154 mM NaCl, and 0.02% NaN₃ (pH 8.2) buffer. The buffer was filtered through a 0.22 µm filter (Membrane filters type GV, Duropore[®], Millipore, Bedford, MA, USA). The column was washed with an aqueous ethanol solution (20%). Two hundred microliters of plasma were injected and elution was performed at a flow of 0.35 ml/min. Approximately 0.35 ml fraction were collected. An entire profile was completed within 105 min. The columns were washed for 50 min at the end of each run. Total cholesterol in odd fractions was determined as described above. Areas under the curve (AUC) were used to quantify total cholesterol in LDL, HDL₁ and HDL₂ fractions. Apolipoproteins were studied with coomassie staining corresponding to HDL₁ and HDL₂ fractions, performed after resolving on Nu-PAGE 4–12% Bis-Tris gels in MES-SDS buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under reducing conditions.

Kinetic analysis. The SAAMII program (SAAM Institute, Seattle, WA) was used for modelling the data. We used a mono-compartmental model as previously described [21]. As previously evaluated by others [22], it was assumed that the shape of the plasma amino acid curve was the same as that of the precursor in liver, the main site of apo A-I synthesis. Using this methodology, amino acid recycling is then taken into account. Moreover, plasma leucine has been described in dog as an excellent predictor of the intracellular leucine in liver [23]. A labeling input was done after a delay from plasma free leucine tracer-to-tracee ratio (as forcing function). In this model k01 represented HDL-apo A-I fractional catabolic rate (FCR), as HDL particle uptake by tissues including liver. The absolute production rate (APR), in milligrams per kg per hour, was calculated as the product of FCR and the pool size of apo A-I in the lipoprotein fraction [24]. Plasma volume was estimated as 4.5% of body weight.

Statistical analysis. Data are reported as means ± SEM. Statistical analysis using StatView 5.0 (SAS institute, Cary, NC) was performed with the Wilcoxon paired test to determine

significant differences between parameters before and after atorvastatin treatment. A 2-sided *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Clinical and biochemical characteristics. Table 1 shows the characteristics of dogs (n=7) before and after 6 weeks of atorvastatin treatment at 5mg/kg/day. Body weight did not change with treatment. Atorvastatin decreased total cholesterol and cholesteryl esters (4.82 ± 0.18 vs 3.33 ± 0.23 , 3.40 ± 0.07 vs 2.25 ± 0.12 mmol/L, respectively, $p < 0.05$) as well as triglycerides, phospholipids and free fatty acids (1.03 ± 0.09 vs 0.82 ± 0.07 , 4.52 ± 0.16 vs 3.53 ± 0.08 , 1.25 ± 0.17 vs 0.69 ± 0.08 mmol/L, respectively, $p < 0.05$). Plasma HDL-apo A-I was lower after treatment (2.36 ± 0.03 vs 1.55 ± 0.04 g/L, $p < 0.05$) as well as HDL-cholesterol (3.56 ± 0.24 vs 2.64 ± 0.15 mmol/L, $p < 0.05$). Areas under the curves, calculated from fast lipoprotein liquid chromatography profiles (see below), showed a decreased in HDL₁-cholesterol and LDL-cholesterol fractions ($p < 0.05$ for both) but HDL₂-cholesterol was not significantly different. HDL-cholesterol/total cholesterol ratio and HDL-triglycerides did not change. HDL-phospholipids were lower (4.28 ± 0.13 vs 3.29 ± 0.13 mmol/L, $p < 0.05$) related to a decreased PLTP activity (0.83 ± 0.05 vs 0.60 ± 0.05 pmol/ μ l/min, $p < 0.05$). Atorvastatin treatment changed neither HL nor LCAT activity.

Fast Protein Liquid Chromatography profiles. Mean plasma lipoprotein total cholesterol profile (n=7) is shown in figure 1A. As previously reported [25], most of the plasma cholesterol was in HDL-size particle. VLDL-cholesterol was not detectable. As discussed above, areas under the curve showed a decrease in LDL-cholesterol and HDL₁-cholesterol fractions ($p < 0.05$ for both) but HDL₂-cholesterol did not change after drug treatment (see table I). As shown in a representative coomassie staining (figure 1B), atorvastatin treatment decreased HDL₁-apo A-I levels but increased HDL₁-apo E levels. Apo A-I and apo E levels did not change in HDL₂ (figure 1B).

Hepatic cholesterol levels and SR-BI expression. Hepatic total cholesterol levels are shown in figure 2A. Treatment with atorvastatin resulted in a significant decline in hepatic total cholesterol levels, as shown in figure 2A (1.09 ± 0.20 vs 0.63 ± 0.08 mg/g, $p < 0.05$). However, lower cholesterol level did not change hepatic SR-BI expression, as shown in a representative immunoblot (figure 2B).

HDL-apo A-I kinetic data. Figure 3 shows the mean time course of enrichments during perfusion of tracers in dogs ($n=7$) before and after atorvastatin treatment. Model fitted lines and experimental points showed close agreement. Kinetic parameters are presented in Table 2. HDL-apo A-I levels calculated by model decreased significantly (2.33 ± 0.04 vs 1.53 ± 0.05 g/L, $p < 0.05$) and were not significantly different from chemically measured values. Apo A-I APR and FCR were both higher after atorvastatin treatment (0.592 ± 0.095 vs 1.337 ± 0.254 mg/kg/h, 0.006 ± 0.001 vs 0.019 ± 0.004 h⁻¹, respectively, $p < 0.05$).

Discussion

We tested the effects of atorvastatin (5mg/kg/day) on HDL-apo A-I metabolism in dog. Drug treatment increased HDL-apo A-I production (2 fold, $p < 0.05$) but higher HDL-apo A-I fractional catabolic rate (3 fold, $p < 0.05$) resulted in lower HDL-apo A-I levels ($p < 0.05$), through a decrease in HDL₁-apo A-I subfraction (figure 1B). Changes in HDL-apo E content probably contributed to the higher HDL-apo A-I FCR. Although atorvastatin 1mg/kg/day in dog would be more equivalent to the highest dose administered to humans (80mg/day), the 5mg/kg/day dose was chosen to induce a very significant HDL-lowering effect. We therefore investigate the mechanism involved in this decline.

An important question is whether the effects of atorvastatin on HDL metabolism would influence reverse cholesterol transport, a process directly related to atherosclerosis. In a positive way, HDL-apo A-I production was significantly increased with drug treatment.

Increased apo A-I production is known to prevent CAD in mouse [26] and hyper-alphalipoproteinemic subjects [27]. In vitro, statins have been found to stimulate apo A-I production through a Rho inhibition and a peroxisome proliferator-activated receptor- α activation [4; 28]. As previously described in humans treated with pravastatin [5], our results suggest a similar effect in vivo, even if the higher apo A-I production reported here was offset by a higher HDL-apo A-I FCR.

Similarly, atorvastatin (5mg/kg/day) in rabbit (a species with high CETP activity) tended to increase apo A-I production rate but higher apo A-I catabolism decreased plasma apo A-I levels [10]. In this study, however, enhanced apo A-I catabolism was partly explained by a striking HDL-TG enrichment. This mechanism that is secondary to both higher CETP and HL activity is known to increase HDL-apo A-I catabolism [29]. Because HL-mediated lipolysis of TG-enriched HDL has been suggested to be pro-atherogenic [11], atorvastatin-induced HDL catabolism would decrease reverse cholesterol transport in these conditions. This possibility is somewhat surprising because statin treatment has been shown to decrease CETP activity in rabbit [30]. Moreover, atorvastatin is known to inhibit both CETP [8,12,13] and HL activity [31] in humans.

Despite the lack of CETP activity in the dog, it is interesting to note that the same atorvastatin dose led to similar effects on HDL-apo A-I catabolism. However, our data do not indicate any impairment of reverse cholesterol transport because (i) apo A-I absolute production rate was significantly higher (ii) increased apo A-I catabolism was not directly related to HDL-TG enrichment and higher HL activity since these parameters were not affected by drug treatment, (iii) atorvastatin did not change LCAT activity but decreased PLTP activity, an effect supposed to be anti-atherogenic [32]. We therefore suggest that enhanced HDL-apo A-I catabolism could be due to a higher liver uptake of apo E-enriched large HDL₁ as a result of a decreased hepatic cholesterol pool. The mechanism of apo E

enrichment in HDL₁ remains unclear and may be dose-related, species-dependent or canine specific. In humans, HDL-apo E concentration has been shown to be unaffected [33] or decreased [6] by atorvastatin at 40mg/day. Nevertheless, apo E-enrichment of HDL₁ may contribute to a higher affinity for SR-BI [34] and the LDL-receptor [35] and thereby increase HDL clearance. Although atorvastatin had no effect on SR-BI expression (figure 2B), HDL-apo A-I catabolism was probably exacerbated by an increased LDL-receptor expression with drug treatment [36]. Impact of apo E on HDL-apo A-I kinetics has already been suggested in healthy humans treated with pravastatin [5]. In this study, HDL-apo A-I FCR only increased in subjects with apo E 3/3 phenotype, while no change occurred in apo E 2/4 subject (apo E2 is characterized by deficient binding to the LDL-receptor). By playing a major role in the binding of large HDL to SR-BI and LDL-receptor, apo E might directly influence HDL-apo A-I catabolism.

Overall, the present data suggest two mechanisms that would increase HDL-apo A-I catabolism. First, a pro-atherogenic catabolism of TG-enriched HDL combined with HL action that would decrease HDL anti-atherosclerotic functions in insulin resistant, hypertriglyceridemic states [11]. Second, an anti-atherogenic HDL-catabolism through HDL-C uptake by the liver, induced by statin treatment that would contribute to accelerate the rate of reverse cholesterol transport. However, assessment of reverse cholesterol transport (using cholesterol labelling with mevalonate) would be needed to test this second hypothesis and establish a positive effect of atorvastatin on HDL₁-C uptake by liver receptors in dog. It should also be recognized that it is difficult to extrapolate our data to human treated with higher dose of atorvastatin. Statins are all known to stimulate LDL-receptor expression [37] but HDL-lowering effect only occurs with atorvastatin at 80mg/day [3,9]. Therefore, our study mainly suggests that the HDL-lowering effect of atorvastatin appears to be CETP-independent.

Nevertheless, our results are more encouraging if we speculate that atorvastatin treatment effectively enhances reverse cholesterol transport when CETP activity is lacking. Recently, raising HDL-C levels in humans with CETP inhibitor torcetrapib increased HDL particle size [38] with higher apo E levels [39] and decreased HDL-apo A-I catabolism, without any effect on reverse cholesterol transport [40]. Interestingly, combination of atorvastatin (20mg) and torcetrapib did not decrease HDL-apo A-I catabolism [40]. Another important question is whether higher dose of atorvastatin (40-80mg) with torcetrapib would increase reverse cholesterol transport through a large-apo E enriched HDL uptake. This mechanism is suggested in the present study because atorvastatin treatment decreased large HDL₁ levels. However, since dog is not representing CETP inhibition in humans, trials that directly assess the effects of atorvastatin/torcetrapib treatment on reverse cholesterol transport would be necessary to test this possibility.

In conclusion, atorvastatin upregulated HDL-apo A-I production, but this drug also increased HDL-apo A-I FCR in dogs. Although the HDL-lowering effect of atorvastatin at high dose appears to be CETP-independent, further studies are needed to understand the mechanism involved in this decrease.

References

- 1 Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005;**4**:193-205.
- 2 Nicholls SJ, Rye KA, Barter PJ. High-density lipoproteins as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol* 2005;**16**:345-9.
- 3 Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998;**81**:582-7.
- 4 Maejima T, Yamazaki H, Aoki T, Tamaki T, Sato F, Kitahara M *et al*. Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**324**:835-9.
- 5 Schaefer JR, Schweer H, Ikewaki K, Stracke H, Seyberth HJ, Kaffarnik H *et al*. Metabolic basis of high density lipoproteins and apolipoprotein A-I increase by HMG-CoA reductase inhibition in healthy subjects and a patient with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1999;**144**:177-84.
- 6 Bach-Ngohou K, Ouguerram K, Frenais R, Maugere P, Ripolles-Piquer B, Zair Y *et al*. Influence of atorvastatin on apolipoprotein E and AI kinetics in type 2 diabetes patients. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**315**:363-9.

- 7 Bilz S, Wagner S, Schmitz M, Bedynek A, Keller U, Demant T. Effects of atorvastatin versus fenofibrate on apoB-100 and apoA-I kinetics in mixed hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2004;**45**:174-85.
- 8 Watts GF, Barrett PH, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD *et al*. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes* 2003;**52**:803-11.
- 9 Wierzbicki AS, Lumb PJ, Semra Y, Chik G, Christ ER, Crook MA. Atorvastatin compared with simvastatin-based therapies in the management of severe familial hyperlipidaemias. *QJM* 1999;**92**:387-94.
- 10 Rashid S, Uffelman KD, Barrett PH, Lewis GF. Effect of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I production and clearance in the New Zealand white rabbit. *Circulation* 2002;**106**:2955-60.
- 11 Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem* 2003;**36**:421-9.
- 12 Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:189-97.

- 13 van Venrooij FV, Stolk RP, Banga JD, Sijmonsma TP, van Tol A, Erkelens DW *et al.* Common cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and the effect of atorvastatin therapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;**26**:1216-23.
- 14 Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* 2004;**34**:527-34.
- 15 Mahley RW, Weisgraber KH. Canine lipoproteins and atherosclerosis. I. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ Res* 1974;**35**:713-21.
- 16 Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997;**387**:414-7.
- 17 Downs LG, Zani V, Wills JM, Crispin SM, Bolton CH. Changes in plasma lipoprotein during the oestrous cycle of the bitch. *Res Vet Sci* 1994;**56**:82-8.
- 18 Havel RJ, Eder A, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;**34**:1345-53.
- 19 Barrie J, Nash AS, Watson TDG. Quantitative analysis of canine plasma lipoproteins. *J Small Anim Pract* 1993;**34**:226-31.

- 20 Frénais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Maugère P, Krempf M *et al.* High density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia* 1997;**40**:578-83.
- 21 Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E *et al.* Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity. An in vivo approach using stable isotopes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;**138**:339-45.
- 22 Parhofer KG, Hugh P, Barrett R, Bier DM, Schonfeld G. Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes. *J Lipid Res* 1991;**32**:1311-23.
- 23 Horber FF, Horber-Feyder CM, Kraye S, Schwenk WF, Haymond MW. Plasma reciprocal pool specific activity predicts that of intracellular free leucine for protein synthesis. *Am J Physiol* 1989;**257**:E385-99.
- 24 Foster DM, Barrett PHR, Toffolo G, Beltz WF, Cobelli C. Estimating the fractional synthetic rate of plasma apolipoproteins and lipids from stable isotope data. *J Lipid Res* 1993;**34**:2193-205.
- 25 Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, Ouguerram K Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* 2003;**52**:559-64.

- 26 Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Pure E, Rader DJ. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* 1999;**100**:1816-22.
- 27 Rader DJ, Schaefer JR, Lohse P, Ikewaki K, Thomas F, Harris WA *et al*. Increased production of apolipoprotein A-I associated with elevated plasma levels of high-density lipoproteins, apolipoprotein A-I, and lipoprotein A-I in a patient with familial hyperalphalipoproteinemia. *Metabolism* 1993;**42**:1429-34.
- 28 Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, *et al*. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* 2001;**107**:1423-32.
- 29 Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, Barrett PH *et al*. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest* 1999;**103**:1191-9.
- 30 Meijer GW, Groener JE, Beynen AC, Van Tol A. Lowering of serum cholesteryl ester transfer protein--but not lecithin:cholesterol acyltransferase--activity levels by hypocholesterolemic drugs in the rabbit. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998;**12**:13-18.
- 31 Berk-Planken II, Hoogerbrugge N, Stolk RP, Bootsma AH, Jansen H; DALI Study Group. Atorvastatin dose-dependently decreases hepatic lipase activity in type 2 diabetes: effect of sex and the LIPC promoter variant. *Diabetes Care* 2003;**26**: 427-32.

- 32 Tall AR, Lalanne F. Phospholipid transfer protein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**:1484-5.
- 33 Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C *et al.* Effect of atorvastatin on plasma apoE metabolism in patients with combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2002;**43**:1464-71.
- 34 Arai T, Rinninger F, Varban L, Fairchild-Huntress V, Liang CP, Chen W *et al.* Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:12050-55.
- 35 Marmillot P, Rao MN, Liu QH, Lakshman MR. Desialylation of human apolipoprotein E decreases its binding to human high-density lipoprotein and its ability to deliver esterified cholesterol to the liver. *Metabolism* 1999;**48**:1184-92.
- 36 Morikawa S, Umetani M, Nakagawa S, Yamazaki H, Suganami H, Inoue K *et al.* Relative induction of mRNA for HMG CoA reductase and LDL receptor by five different HMG-CoA reductase inhibitors in cultured human cells. *J Atheroscler Thromb* 2000;**7**:138-44.
- 37 Vaughan CJ, Gotto AM Jr. Update on statins: 2003. *Circulation* 2004;**110**:886-92.
- 38 Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW *et al.* Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2004;**350**:1505-15.

39 Clark RW, Sutfin TA, Ruggeri RB, Willauer AT, Sugarman ED, Magnus-Aryitey G *et al.* Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:490-97.

40 Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, Nartsupha C, Asztalos BF, Welty FK *et al.* Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1-8.

Figure legends

Fig. 1. Fast Protein Liquid Chromatography profiles of (A) mean plasma lipoprotein total cholesterol (n=7) before (○) and after (●) atorvastatin treatment (5mg/kg/day for 6 weeks), (B) coomassie staining from fraction 47 (corresponding to HDL₁) and fraction 51 (corresponding to HDL₂) in a representative dog,. Apo E and apo A-I are indicated by arrows.

Fig. 2. Mean hepatic total cholesterol levels (mg cholesterol/g liver, n=7, *p<0.05) (A) and SR-BI expression (B) by immunoblot in a representative dog, before and after atorvastatin treatment (5mg/kg/day for 6 weeks). β -actin was used as loading control for immunoblot.

Fig. 3. Time course enrichments during perfusion of [5,5,5-²H₃]leucine in HDL-apoA-I, before (○) and after (●) atorvastatin treatment (5mg/kg/day for 6 weeks), (n=7, mean $\pm$ SEM). Lines represent calculated fits.

TABLE 1

Characteristics of the 7 studied animals before and after atorvastatin treatment (5mg/kg/day for 6 weeks)

Animals	Before	After
Body weight (kg)	11.1 ± 0.03	10.8 ± 0.2
Total cholesterol (mmol/L)	4.82 ± 0.18	3.33 ± 0.23*
Cholesteryl esters (mmol/L)	3.40 ± 0.07	2.25 ± 0.12*
Triglycerides (mmol/L)	1.03 ± 0.09	0.82 ± 0.07*
Phospholipids (mmol/L)	4.52 ± 0.16	3.53 ± 0.08*
Free fatty acids (mmol/L)	1.25 ± 0.17	0.69 ± 0.08*
HDL-apo A-I (g/L)	2.36 ± 0.03	1.55 ± 0.04*
HDL-cholesterol (mmol/L)	3.56 ± 0.24	2.64 ± 0.15*
HDL1-cholesterol AUC (AU)	0.79 ± 0.12	0.36 ± 0.06*
HDL2-cholesterol AUC (AU)	3.09 ± 0.18	2.47 ± 0.17
LDL-cholesterol AUC (AU)	0.31 ± 0.03	0.14 ± 0.02*
HDL-cholesterol/total cholesterol	0.74 ± 0.04	0.81 ± 0.05
HDL-triglycerides (mmol/L)	0.038 ± 0.004	0.029 ± 0.003
HDL-phospholipids (mmol/L)	4.28 ± 0.13	3.29 ± 0.13*
PLTP activity (pmol/μL/min)	0.83 ± 0.05	0.60 ± 0.05*
HL activity (pmol/ml/min)	7.16 ± 1.56	6.11 ± 0.41
LCAT activity (AU)	0.83 ± 0.05	0.60 ± 0.05

(* P<0.05, AU arbitrary units, AUC area under the curve, calculated from lipoprotein profiles)

TABLE2

Kinetic data of HDL apolipoprotein A-I before (1) and after (2) atorvastatin treatment (5mg/kg/day for 6 weeks)

	HDL-apoA-I (g/l)	Apo A-I APR (mg/kg/h)	Apo A-I FCR (h-1)	(*P< 0.05)
I-1	2.29	0.669	0.007	
II-1	2.25	0.590	0.006	
III-1	2.25	1.066	0.011	
IV-1	2.36	0.426	0.004	
V-1	2.52	0.393	0.003	
VI-1	2.25	0.686	0.007	
VII-1	2.41	0.317	0.003	
Mean ± SEM	2.33 ± 0.04	0.592 ± 0.095	0.006 ± 0.001	
I-2	1.41	0.794	0.013	
II-2	1.40	0.744	0.012	
III-2	1.50	1.763	0.026	
IV-2	1.56	1.337	0.019	
V-2	1.49	2.426	0.036	
VI-2	1.58	0.804	0.011	
VII-2	1.75	1.490	0.019	
Mean ± SEM	1.53 ± 0.05*	1.337 ± 0.254*	0.019 ± 0.004*	

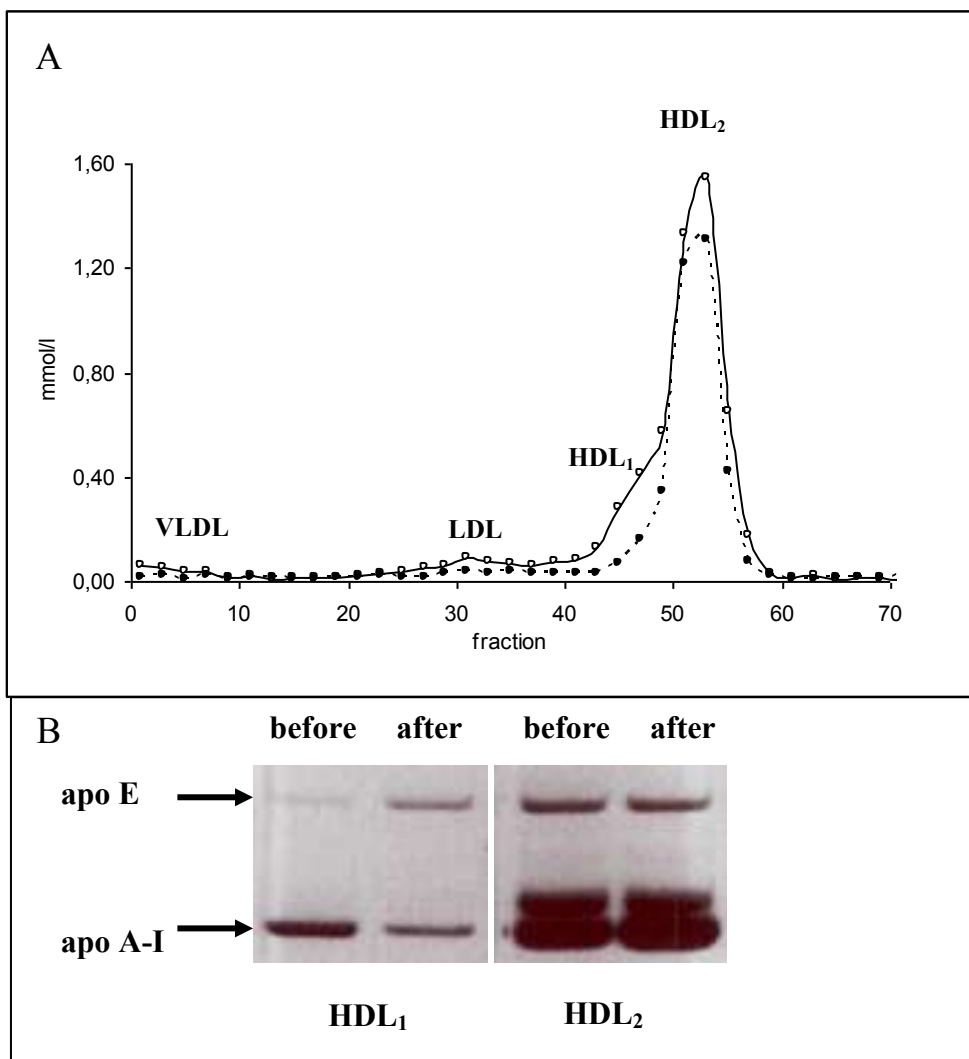


Fig. 1.

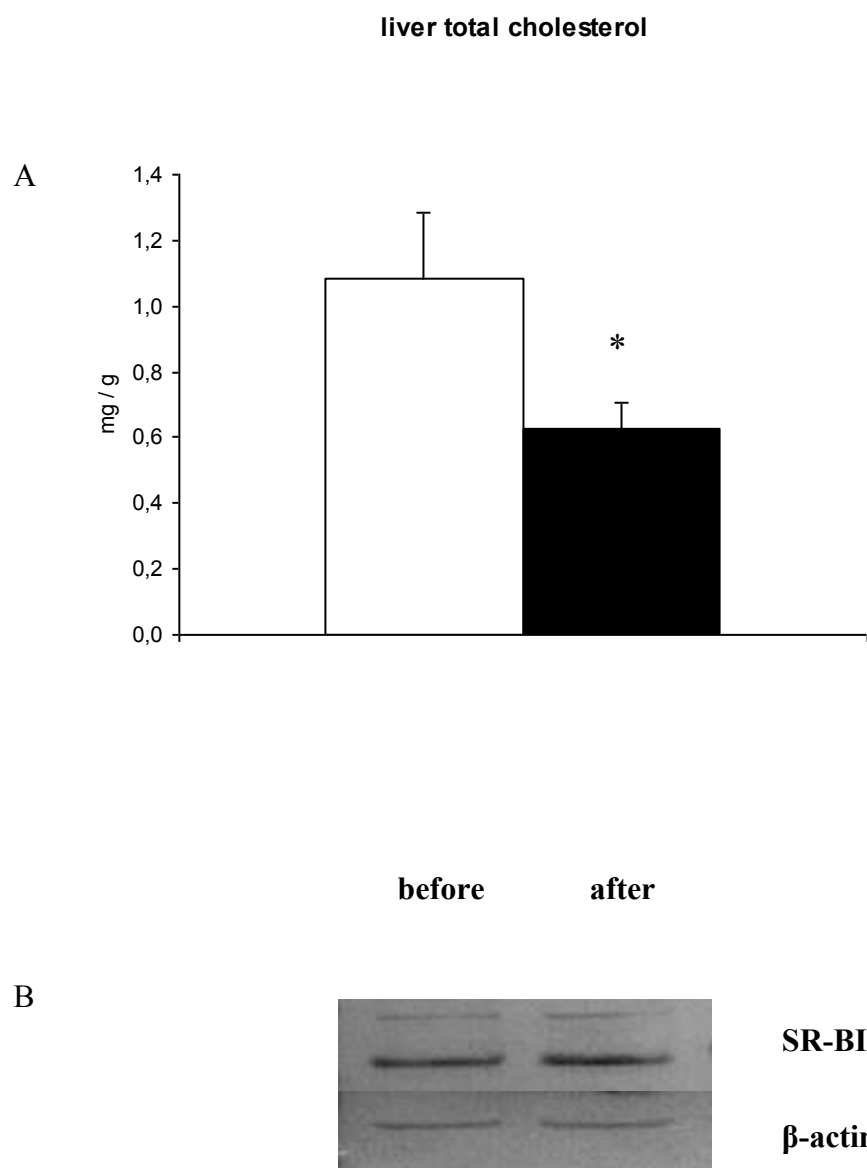


Fig. 2.

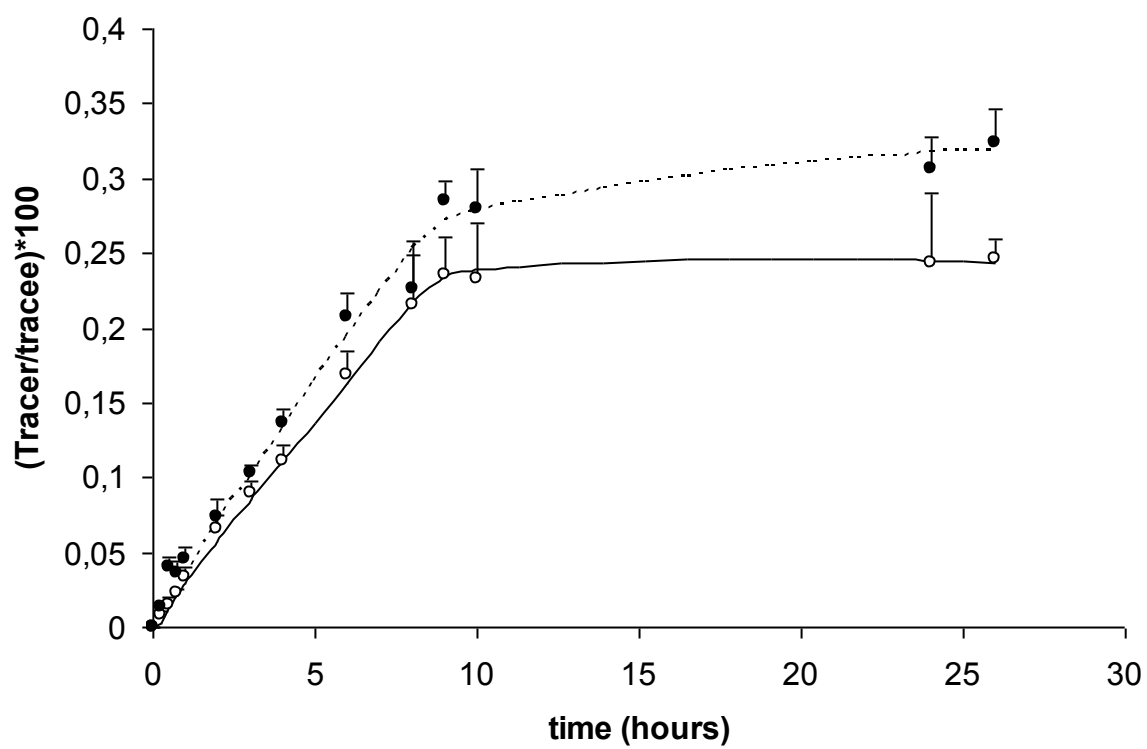


Fig. 3.

VI.2.3 Discussion

La présente étude montre qu'une forte dose d'atorvastatine induit une diminution des taux d'apo A-I et de HDL-cholestérol chez le chien, comme chez l'homme et le lapin. Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation des taux d'apo E dans la fraction des HDL₁, avec une plus forte expression du LDL-receptor. Même si les statines sont connues pour activer le LDL-receptor (Vaughan et al., 2003), l'étude de l'expression de l'ARNm de ce récepteur serait nécessaire pour confirmer nos suggestions. Comme les autres statines, l'atorvastatine augmente le turnover du récepteur (Ness et al., 1998). Néanmoins, l'atorvastatine est la seule statine à induire un hypercatabolisme de l'apo A-I et une baisse des taux de HDL-cholestérol. Comparée à la lovastatine, l'atorvastatine est plus difficilement dissociable des microsomes, ce qui expliquerait son effet hypocholestérolémiant plus puissant (Ness et al., 1998). La comparaison mériterait d'être effectuée avec les autres statines mais cette spécificité de l'atorvastatine pourrait être à l'origine des effets sur le HDL-cholestérol, lorsque cette drogue est administrée à forte dose.

D'autre part, même si nos résultats n'indiquent pas forcément une altération du transport inverse du cholestérol, d'autres paramètres cinétiques sur le métabolisme du cholestérol seraient utiles pour confirmer nos suggestions. Malheureusement, compte tenu du mécanisme d'action de l'atorvastatine, la méthode de marquage du cholestérol par le ¹³C-acétate n'était pas applicable dans notre étude. En effet, vu la forte dose administrée, nous n'avons pas pu détecter un quelconque enrichissement en ¹³C-cholestérol (libre ou estérifié) chez les chiens traités. Pour quantifier le transport inverse du cholestérol, l'utilisation d'un autre isotope précurseur du cholestérol (mévalonate) serait donc nécessaire.

Malgré ses limites, la présente étude montre qu'il est possible d'étudier chez le chien une partie des acteurs du transport inverse du cholestérol comme la HL, la LCAT, la PLTP ou encore le SR-BI. Mais du fait de l'absence de CETP, l'extrapolation de nos résultats à l'homme reste difficile. Cependant, l'inhibiteur de CETP torcetrapib provoque également un enrichissement des HDL en apo E (Clark et al., 2004). En stimulant l'expression du LDL-receptor, l'atorvastatine, comme chez le chien, faciliterait la capture de ces HDL enrichis en

apo E lors d'une combinaison avec le torcetrapib. Ceci expliquerait pourquoi le catabolisme de l'apo A-I des HDL n'est pas affecté par la combinaison atorvastatine/torcetrapib (Brousseau et al., 2005). Les effets anti-athérogènes de cette combinaison restent néanmoins à montrer chez l'homme au travers d'études à plus long terme.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le chien obèse insulino-résistant a été décrit par notre équipe comme présentant des désordres métaboliques en partie similaires à ceux décrits chez l'homme : dyslipidémie (Bailhache et al., 2003), taux de TNF α et d'IGF-1 augmentés (Gayet et al., 2004), baisse d'expression de PPAR γ (Leray et al., 2004) dans le tissu adipeux viscéral. A partir de ces données, notre objectif principal a été de poursuivre le développement de ce modèle pour confirmer son intérêt dans l'étude du syndrome métabolique. Ce travail s'est donc basé sur l'étude de l'absorption intestinale du cholestérol et son transport inverse chez le chien, deux processus qui jouent un rôle significatif dans les maladies cardiovasculaires et qui font l'objet d'investigations pharmacologiques.

Absorption intestinale du cholestérol et lipémie postprandiale

Le développement d'une méthode de mesure de l'absorption intestinale du cholestérol a représenté notre premier objectif. En appliquant la méthode de Zilversmit, basée sur l'utilisation d'isotopes stables, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol chez le chien traité par l'atorvastatine (article n°1). Les résultats de cette première étude suggèrent un rôle de la voie apo B-indépendante et un rôle mineur de SR-BI dans ces conditions. Pour le confirmer, il faudrait mener des études complémentaires sur les récepteurs impliqués dans l'absorption intestinale du cholestérol (récepteurs ABC, NPC1L1). Un important travail de mise au point serait nécessaire pour mesurer l'expression des ARNm de ces récepteurs, ainsi que l'expression des protéines (développement d'anticorps spécifiques) en situation d'insulino-résistance ou lors d'un traitement pharmacologique. L'activité des récepteurs nucléaires (LXR, par exemple) contrôlant l'expression de ces récepteurs mériterait également d'être mesurée.

Chez le chien comme chez l'homme, l'absorption intestinale du cholestérol est réduite en situation d'insulino-résistance (article n°2). Cette diminution co-existerait avec une surproduction intestinale de lipoprotéines. Confirmer cette hypothèse nécessiterait d'étudier un certain nombre de paramètres au niveau intestinal: expression de la MTP, activité de l'ACAT2, production des chylomicrons par l'entérocyte, etc.

Bien qu'il ne soit pas possible de conclure sur tous les points, la dyslipidémie postprandiale observée chez le chien obèse insulino-résistant confirme l'intérêt de ce modèle

pour tester les effets des molécules hypolipémiantes (article n°3). La phase postprandiale jouant un rôle majeur dans le risque cardiovasculaire, son étude est utile, sinon indispensable, pour évaluer les effets d'un traitement hypolipémiant, comme on a pu le montrer chez l'homme avec l'atorvastatine (Parhofer et al., 2003) ou la rosiglitazone (van Wijk et al., 2005).

Transport inverse du cholestérol

Les études cinétiques (article n°4 et n°5) que nous avons menées montrent l'intérêt du modèle pour étudier le transport inverse du cholestérol. En effet, compte tenu de l'absence d'activité CETP (Bailhache et al., 2004), le cholestérol est très majoritairement véhiculé par les HDL, avec une capture sélective SR-BI dépendante qui représente 60% du catabolisme des esters de cholestérol des HDL. Ce mécanisme, très sensiblement altéré chez le chien obèse insulino-résistant (article n°4), constitue une cible pharmacologique intéressante pour réduire le risque cardiovasculaire. En effet, le cholestérol capté par le SR-BI est éliminé dans la bile (Ji et al., 1999). Notre modèle est donc particulièrement adapté à l'étude de la modulation nutritionnelle et pharmacologique de ce mécanisme anti-athérogène. Comme pour l'absorption intestinale, des informations complémentaires sur l'activité des récepteurs ABC et LDL-receptor optimiseraient notre modèle pour étudier le transport inverse du cholestérol.

Perspectives pour le développement du modèle chien obèse insulino-résistant

Même si les données présentées dans ce manuscrit devraient être approfondies, le modèle que nous avons utilisé pourrait être exploité pour d'autres études.

Au niveau pharmacologique, par comparaison aux rongeurs, l'évaluation des agonistes de PPAR α et PPAR γ , de PPAR α/γ chez le chien serait plus fiable pour prédire les effets de ces molécules chez l'homme. En effet, la séquence d'acides aminés du PPAR α canin est très proche de celle de l'homme (95% d'homologie). Nous avons montré les effets hypolipémiant du fénofibrate sur notre modèle (Serisier et al., sous presse). Par ailleurs, l'administration de la rosiglitazone provoque des effets similaires à ceux décrits chez l'homme, notamment au niveau de la sensibilité à l'insuline, mais aussi au niveau de la prise de poids. Par rapport à la souris, au rat ou même au chien sain, l'évaluation des doubles agonistes PPAR α/γ chez le

chien obèse insulino-résistant apporterait donc des informations plus pertinentes sur les effets de ces molécules.

Le modèle pourrait être également utilisé pour l'étude des dysfonctionnements cardiovasculaires (pour revue, Yarbrough et al., 2003) et l'implication des lipides et des PPAR dans ces mécanismes physiopathologiques (Lionetti et al., 2005; Nemoto et al., 2005). De plus, le chien obèse insulino-résistant est un modèle qui a aussi été utilisé pour étudier l'hypertension (Rocchini et al., 2004) et la dysfonction endothéliale (Villa et al., 1999). Bien que le chien soit résistant à l'athérosclérose en dehors de situations pathologiques telles que l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie, l'hypothyroïdie (Liu et al., 1986) et les infections à *Chlamydia* (Sako et al., 2002), il est néanmoins possible de l'utiliser pour étudier les dysfonctionnements cardiovasculaires associés à l'insulino-résistance.

Sur le plan nutritionnel, les effets du régime en période gestationnelle et néonatale, ainsi que les conséquences à plus long terme mériteraient également d'être étudiés. La composition du régime en période néonatale aurait en effet des conséquences sur le profil lipoprotéique chez l'homme adulte (McGill et al., 1996). Chez les primates, l'allaitement maternel augmente l'expression du LDL-receptor (Mott et al., 1993). Chez la chienne en gestation, les effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés n-3 sur la cholestérolémie des nouveaux-nés ont également été montrés (Wright et al., 2004). Compte tenu de la durée de vie du chien, il serait en outre intéressant d'étudier les relations entre nutrition gestationnelle et néonatale et la réponse aux régimes hyperénergétiques pendant la croissance et l'âge adulte.

REFERENCES

A

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:518-20.

Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Lewis GF. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:170-6.

Aggarwal D, West KL, Zern TL, Shrestha S, Vergara-Jimenez M, Fernandez ML. JTT-130, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor lowers plasma triglycerides and LDL cholesterol concentrations without increasing hepatic triglycerides in guinea pigs. *BMC Cardiovasc Disord* 2005 Sep 27;5:30.

Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:630-7.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.

Alenezi MY, Marcil M, Blank D, Sherman M, Genest J Jr. Is the decreased high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome due to cellular lipid efflux defect? *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:761-4.

Al-Shaer MH, Choueiri NE, Suleiman ES. The pivotal role of cholesterol absorption inhibitors in the management of dyslipidemia. *Lipids Health Dis* 2004;3:22-27.

Altmann SW, Davis HR Jr, Yao X, Lavery M, Compton DS, Zhu LJ, Crona JH, Caplen MA, Hoos LM, Tetzloff G, Priestley T, Burnett DA, Strader CD, Graziano MP. The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochim Biophys Acta* 2002;1580:77-93.

Références

Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303:1201-4.

Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, Olofsson SO, Linden D, Oscarsson J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005;280:1224-9.

Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 2001;276:28857-65.

Anderson RA, Joyce C, Davis M, Reagan JW, Clark M, Shelness GS, Rudel LL. Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol Chem* 1998;273:26747-54.

Annuzzi G, De Natale C, Iovine C, Patti L, Di Marino L, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Rivellese AA. Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2397-402.

Armstrong MJ, Carey MC. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *J Lipid Res* 1997;28:1144-55.

Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* 1995;27:435-8.

Aronne LJ, Segal KR. Adiposity and fat distribution outcome measures: assessment and clinical implications. *Obes Res* 2002 10 Suppl 1:14S-21S.

B

Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, Ouguerram K. Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* 2003 May;52:559-64.

Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* 2004;34:527-34.

Bakillah A, Nayak N, Saxena U, Medford RM, Hussain MM. Decreased secretion of ApoB follows inhibition of ApoB-MTP binding by a novel antagonist. *Biochemistry* 2000;39:4892-9.

Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442-3.

Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:717-26.

Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:160-7.

Batista MC, Welty FK, Diffenderfer MR, Sarnak MJ, Schaefer EJ, Lamon-Fava S, *et al.* Apolipoprotein A-I, B-100, and B-48 metabolism in subjects with chronic kidney disease, obesity, and the metabolic syndrome. *Metabolism* 2004;53:1255-61.

Beaumier-Gallon G, Dubois C, Senft M, Vergnes MF, Pauli AM, Portugal H, Lairon D. Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001;73:870-7.

Benoist F, Grand-Perret T. Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation

Références

studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 1997;272:20435-42.

Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-5.

Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest* 1981;68:1456-67.

Bietrix F, Daoguang Y, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, Shaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F, Collet X. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006 Jan 18; [Epub ahead of print]

Bischoff H, Angerbauer R, Boberg M, Petzinna D, Schmidt D, Steinke W, Thomas G. Preclinical review of cerivastatin sodium--a step forward in HMG-CoA reductase inhibition. *Atherosclerosis* 1998;139:S7-13.

Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, Wiklund O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* 1996;123:43-56.

Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 1997;46:524-7.

Blades B, Vega GL, Grundy SM. Activities of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in postheparin plasma of patients with low concentrations of HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1227-35.

Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol* 2000;86:19L-22L.

Références

- Bojanovski D, Gregg RE, Zech LA, Meng MS, Bishop C, Ronan R, Brewer HB Jr. In vivo metabolism of proapolipoprotein A-I in Tangier disease. *J Clin Invest* 1987;80:1742-7.
- Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 2003;33:1051-69.
- Borgstrom B. Quantitative aspects of the intestinal absorption and metabolism of cholesterol and beta-sitosterol in the rat. *J Lipid Res* 1968;9:473-81.
- Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 1999;40:302-8.
- Boren J, Graham L, Wettsten M, Scott J, White A, Olofsson SO. The assembly and secretion of apoB100-containing lipoproteins in Hep G2 cells: apo B100 is cotranslationally integrated into lipoproteins. *J Biol Chem* 1992;267:9858-67.
- Briand F, Magot T, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K. Effects of atorvastatin on high density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism in dogs. *Eur J Clin Invest* 2006;36:224-30.
- Briand F, Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Magot T, Ouguerram K. Metabolism of high density lipoprotein apolipoprotein A-I and cholesteryl esters in insulin resistant dogs: a stable isotope study. *Diabetes Obes Metab* 2006; sous presse.
- Briand F, Serisier S, Krempf M, Magot T, Ouguerram K, Nguyen P. Atorvastatin increases intestinal cholesterol absorption in dog. *J Nutr* 2006; sous presse.

Références

Brites FD, Bonavita CD, De Geitere C, Cloes M, Delfly B, Yael MJ, Fruchart J, Wikinski RW, Castro GR. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2000;152:181-92.

Broedl UC, Jin W, Rader DJ. Endothelial lipase: a modulator of lipoprotein metabolism upregulated by inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:202-6.

Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, Mancuso JP, Rader DJ. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2004;350:1505-15.

Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, Nartsupha C, Asztalos BF, Welty FK, Wolfe ML, Rudling M, Bjorkhem I, Angelin B, Mancuso JP, Digenio AG, Rader DJ, Schaefer EJ. Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1057-64.

Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7488-93.

Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:1052-62.

Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998;2:559-69.

Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005;42:987-1000.

Références

Burrier RE, Smith AA, McGregor DG, Hoos LM, Zilli DL, Davis HR Jr. The effect of acyl CoA: cholesterol acyltransferase inhibition on the uptake, esterification and secretion of cholesterol by the hamster small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:156-63.

Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S, Farese RV Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:1341-7.

C

Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res* 2001;42:902-9.

Campos H, Moye LA, Glasser SP, Stampfer MJ, Sacks FM. Low-density lipoprotein size, pravastatin treatment, and coronary events. *JAMA* 2001;286:1468-74.

Cartwright IJ, Higgins JA. Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *J Biol Chem* 2001;276:48048-57.

Catapano AL. Apolipoprotein CII and lipoprotein lipase activity. *La Ricerca Clin Lab* 1982;12:437-47.

Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia* 2005;48:1948-56.

Cefalu WT. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:13-26.

Chaikoff IL, Bloom B, Siperstein MD, Kiyasu JY, Reinhardt WO, Dauben WG, Eastham JF. C¹⁴-Cholesterol. I. Lymphatic transport of absorbed cholesterol-4-C¹⁴. *J Biol Chem* 1952;194:407-412.

Références

Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Mamo JC, Redgrave TG. Markers of triglyceride-rich lipoprotein remnant metabolism in visceral obesity. *Clin Chem* 2002;48:278-83.

Chan DC, Barrett PH, Watts GF. Lipoprotein transport in the metabolic syndrome: methodological aspects of stable isotope kinetic studies. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:221-32.

Chan DC, Barrett PH, Watts GF. Lipoprotein transport in the metabolic syndrome: pathophysiological and interventional studies employing stable isotopy and modelling methods. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:233-49.

Chan L, Chang BH, Nakamuta M, Li WH, Smith LC. Apobec-1 and apolipoprotein B mRNA editing. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:11-26.

Chandler CE, Wilder DE, Pettini JL, Savoy YE, Petras SF, Chang G, Vincent J, Harwood HJ Jr. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *J Lipid Res* 2003;44:1887-901.

Chang TY, Chang CC, Lin S, Yu C, Li BL, Miyazaki A. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:289-96.

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001;7:161-71.

Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000;101:2411-7.

Chuang M-Y, Wong L, Gallaher WR, Thompson JJ, Roheim PS. Production and characterization of a monoclonal antibody to dog hepatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 1985;833:69-81.

Références

- Chung H, Randolph A, Reardon I, Heinrikson RL. The covalent structure of apolipoprotein A-I from canine high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1982;257:2961-7.
- Clark RW, Sutfin TA, Ruggeri RB, Willauer AT, Sugarman ED, Magnus-Aryitey G *et al.* Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:490-97.
- Clee SM, Zhang H, Bissada N, Miao L, Ehrenborg E, Benlian P, Shen GX, Angel A, LeBoeuf RC, Hayden MR. Relationship between lipoprotein lipase and high density lipoprotein cholesterol in mice: modulation by cholesteryl ester transfer protein and dietary status. *J Lipid Res* 1997;38:2079-89.
- Cohen DE. Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:295-302.
- Connelly PW, Hegele RA. Hepatic lipase deficiency. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998;35:547-72.
- Curtin A, Deegan P, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Alterations in apolipoprotein B-48 in the postprandial state in NIDDM. *Diabetologia* 1994;37:1259-64.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000;105:311-20.

D

Dallinga-Thie GM, Groenendijk M, Blom RN, De Bruin TW, De Kant E. Genetic heterogeneity in the apolipoprotein C-III promoter and effects of insulin. *J Lipid Res* 2001;42:1450-6.

Datta S, Li WH, Ghosh I, Luo CC, Chan L. Structure and expression of dog apolipoprotein C-II and C-III mRNAs. Implications for the evolution and functional constraints of apolipoprotein structure. *J Biol Chem* 1987;262:10588-93.

Davis RA, Thrift RN, Wu CC, Howell KE. Apolipoprotein B is both integrated into and translocated across the endoplasmic reticulum: evidence for two functionally distinct pools. *J Biol Chem* 1990;265:10005-11.

Davis HR Jr, Pula KK, Alton KB, Burrier RE, Watkins RW. The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in dogs. *Metabolism* 2001;50:1234-41.

Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:33586-92.

De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214-E223.

deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 2002;106:1321-6.

de Silva HV, Lauer SJ, Wang J, Simonet WS, Weisgraber KH, Mahley RW, Taylor JM. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J Biol Chem* 1994;269:2324-35.

Despres JP, Ferland M, Moorjani S, Nadeau A, Tremblay A, Lupien PJ, Theriault G, Bouchard C. Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women. *Arteriosclerosis* 1989;9:485-92.

Doi SQ, Meinertz H, Nilausen K, Faria EC, Quintao EC. Intestinal cholesterol absorption in the chyluria model. *J Lipid Res* 1987;28:1129-36.

Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefebvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Koranyi L, Laakso M, Mokan M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J; PROactive investigators. the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1279-89.

Downs LG, Bolton CH, Crispin SM, Wills JM. Plasma lipoprotein lipids in five different breeds of dogs. *Res Vet Sci* 1993;54:63-67.

Drobnik W, Lindenthal B, Lieser B, Ritter M, Christiansen Weber T, Liebisch G, Giesa U, Igel M, Borsukova H, Buchler C, Fung-Leung WP, Von Bergmann K, Schmitz G. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology* 2001;120:1203-11.

Duan LP, Wang HH, Wang DQ. Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. *J Lipid Res* 2004;45:1312-23.

Dullaart RP, van Tol A. Role of phospholipid transfer protein and prebeta-high density lipoproteins in maintaining cholesterol efflux from Fu5AH cells to plasma from insulin-resistant subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61:69-74.

Dujovne CA, Ettinger MP, McNeer JF, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Yang B, Veltri EP; Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2002 Nov 15;90(10):1092-7.

Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, Staels B, Lestavel S. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 24;340:1259-63.

E

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365(9468):1415-28.

Evans M, Roberts A, Rees A. The future direction of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:663-9.

Executive Summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.

F

Fainaru M, Funke H, Boyles JK, Ludwig EH, Innerarity TL, Mahley RW. Metabolism of canine beta-very low density lipoproteins in normal and cholesterol-fed dogs. *Arteriosclerosis* 1988;8:130-9.

Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983;72:1737-47.

Fidge NH. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* 1999;40:187-201.

Field FJ, Born E, Mathur SN. Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1 like 1 protein gene expression. *J Lipid Res* 2004;45:2252-9.

Fielding CJ. Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration. *FASEB J* 1992;6:3162-8.

Fisher WR, Venkatakrishnan V, Zech LA, Hall CM, Kilgore LL, Stacpoole PW, Diffenderfer MR, Friday KE, Sumner AE, Marsh JB. Kinetic evidence for both a fast and a slow secretory pathway for apolipoprotein A-I in humans. *J Lipid Res* 1995;36:1618-28.

Fisher WR, Venkatakrishnan V, Fisher ES, Stacpoole PW, Zech LA. The 3H-leucine tracer: its use in kinetic studies of plasma lipoproteins. *Metabolism* 1997;46:333-42.

Florez H, Mendez A, Casanova-Romero P, Larreal-Urdaneta C, Castillo-Florez S, Lee D, Goldberg R. Increased apolipoprotein C-III levels associated with insulin resistance contribute to dyslipidemia in normoglycemic and diabetic subjects from a triethnic population. *Atherosclerosis* 2005 [Epub ahead of print].

Foger B, Ritsch A, Dobliger A, Wessels H, Patsch JR. Relationship of plasma cholesteryl ester transfer protein to HDL cholesterol. Studies in normotriglyceridemia and moderate hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1430-6.

Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance: causative or correlative? *Br J Nutr* 2000;83 Suppl 1:S71-7.

Frénais R, Nazih H, Ouguerram K, Maugeais C, Zair Y, Bard JM *et al.* In vivo evidence for the role of lipoprotein lipase activity in the regulation of apolipoprotein AI metabolism: a kinetic study in control subjects and patients with type II diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1962-7.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:847-50.

Fruchart JC, Staels B, Duriez P. New concepts on the mechanism of action of fibrates and therapeutic prospectives in atherosclerosis. *Bull Acad Natl Med* 2001;185:63-74.

G

Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR Jr, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill KA, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8132-7.

Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res* 1998;39:1263-73.

Galman C, Ostlund-Lindqvist AM, Bjorquist A, Schreyer S, Svensson L, Angelin B, Rudling M. Pharmacological interference with intestinal bile acid transport reduces plasma cholesterol in LDL receptor/apoE deficiency. *FASEB J* 2003;17:265-7.

Gayet C, Bailhache E, Dumon H, Martin L, Siliart B, Nguyen P. Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF α , IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2004;88:157-65.

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000;106:453-8.

Girard J. PPAR γ and insulin resistance. *Ann Endocrinol (Paris)* 2002;63:1S19-22.

Goodman DS, Noble RP. Turnover of plasma cholesterol in man. *J Clin Invest* 1968;47:231-41.

Gordon V, Innerarity TL, Mahley RW. Formation of cholesterol and apoprotein E-enriched high density lipoproteins in vitro. *J Biol Chem* 1983;258:6202-6212.

Gordon DA, Jamil H. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:72-83.

Gotto A, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;128:3-41.

Greene DJ, Skeggs JW, Morton RE. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J Biol Chem* 2001;276:4804-11.

Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1993;34:1367-83.

Groot PH, Pearce NJ, Yates JW, Stocker C, Sauermelch C, Doe CP, Willette RN, Olzinski A, Peters T, d'Epagnier D, Morasco KO, Krawiec JA, Webb CL, Aravindhan K, Jucker B, Burgert M, Ma C, Marino JP, Collins JL, Macphee CH, Thompson SK, Jaye M. Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *J Lipid Res* 2005;46:2182-91.

Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:282-8.

Guerin M, Egger P, Soudant C, Le Goff W, van Tol A, Dupuis R, Chapman MJ. Cholesteryl ester flux from HDL to VLDL-1 is preferentially enhanced in type IIB hyperlipidemia in the postprandial state. *J Lipid Res* 2002;43:1652-60.

Guo Q, Sahoo SP, Wang PR, Milot DP, Ippolito MC, Wu MS, Baffic J, Biswas C, Hernandez M, Lam MH, Sharma N, Han W, Kelly LJ, MacNaul KL, Zhou G, Desai R, Heck JV, Doebber TW, Berger JP, Moller DE, Sparrow CP, Chao YS, Wright SD. A novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonist demonstrates favorable effects on lipid homeostasis. *Endocrinology* 2004;145:1640-8.

Guo Q, Avramoglu RK, Adeli K. Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids. *Metabolism* 2005;54:689-97.

Guyard-Dangremont V, Desrumaux C, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comp Biochem Physiol* 1998;120:517-525.

Gylling H, Miettinen TA. Absorption and metabolism of cholesterol in familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 1989;76:297-301.

Gylling H, Miettinen TA. Inheritance of cholesterol metabolism of probands with high or low cholesterol absorption. *J Lipid Res* 2002;43:1472-6.

Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R, Miettinen TA. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004;45:1660-5.

H

Hagan DL, Kienzle B, Jamil H, Hariharan N. Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem* 1994;269:28737-44.

Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, Adeli K. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem* 2002;277:31646-55.

Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Gylling H, Erkkila AT, Uusitupa MIJ. Comparison of the effects of plant sterols and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:715-25.

Hammad SM, Stefansson S, Twal WO, Drake CJ, Fleming P, Remaley A, Brewer HB Jr, Argraves WS. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10158-63.

Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Danielsen EM. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut* 2003;52:1424-31.

Hayashi H, Sato Y, Kanai S, Ichikawa M, Funakoshi A, Miyasaka K. Increased lymphatic lipid transport in genetically diabetic obese rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G69-76.

Higgins CF. ABC transporters : from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67-113.

Hoffman HN, Fredrickson DS. Tangier disease (familial high density lipoprotein deficiency). Clinical and genetic features in two adults. *Am J Med* 1965 ;39:582-93.

Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 1998;101:2331-9.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002 May;109(9):1125-31.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.

Hsu LA, Ko YL, Wu S, Teng MS, Peng TY, Chen CF, Chen CF, Lee YS. Association between a novel 11-base pair deletion mutation in the promoter region of the scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1869-74.

Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol* 2003; 92(4A):10J-17J.

Huang Y, Hui DY. Metabolic fate of pancreas-derived cholesterol esterase in intestine: an in vitro study using Caco-2 cells. *J Lipid Res* 1990;31:2029-37.

Huggins KW, Camarota LM, Howles PN, Hui DY. Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. *J Biol Chem* 2003;278:42899-905.

Hui DY, Brecht WJ, Hall EA, Friedman G, Innerarity TL, Mahley RW. Isolation and characterization of the apolipoprotein E receptor from canine and human liver. *J Biol Chem* 1986;261:4256-67.

Hui DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:183-92.

Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001;155:269-81.

Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity TL. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem* 1989;264:17931-8.

Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 2000;148:1-15.

Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:281-5.

I

Ikewaki K, Rader DJ, Schaefer JR, Fairwell T, Zech LA, Brewer HB Jr. Evaluation of apoA-I kinetics in humans using simultaneous endogenous stable isotope and exogenous radiotracer methods. *J Lipid Res* 1993;34:2207-15.

Ikewaki K, Nishiwaki M, Sakamoto T, Ishikawa T, Fairwell T, Zech LA, Nagano M, Nakamura H, Brewer HB Jr, Rader DJ. Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1995;96:1573-81.

Ioannou YA. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:657-68.

Iqbal J, Hussain MM. Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. *J Lipid Res* 2005;46:1491-501.

Ishigami M, Yamashita S, Sakai N, Arai T, Hirano K, Hiraoka H, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y. Large and cholesteryl ester-rich high-density lipoproteins in cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency can not protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low-density lipoproteins. *J Biochem (Tokyo)* 1994;116:257-62.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-9.

J

Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, Nauze M, Champagne E, Terce F, Gachet C, Perret B, Collet X, Boeynaems JM, Barbaras R. The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic High-Density Lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2005; [Epub ahead of print].

Jakulj L, Trip MD, Sudhop T, von Begmann K, Kastelein JJP, Vissers MN. Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe: effects on plasma lipid levels. *J Lipid Res* 2005;46: 2692-8.

Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999;21:424-8.

Ji J, Watts GF, Johnson AG, Chan DC, Ooi EM, Rye KA, Serone AP, Barrett PH. High-density Lipoprotein Transport in the Metabolic Syndrome: application of a new model for HDL particle kinetics. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; [Epub ahead of print]

Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 1999;274: 33398-402.

Jiang X, Francone OL, Bruce C, Milne R, Mar J, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 1996;98:2373-80.

Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, Tall AR. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* 1999;103:907-14.

Joki P, Suomalainen H, Jarvinen KM, Juntunen-Backman K, Gylling H, Miettinen TA, Antikainen M. Cholesterol precursors and plant sterols in children with food allergy. *Am J Clin Nutr* 2003;77:51-5.

Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:245-56.

Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998;81:582-7.

Jonkers IJ, Smelt AH, Hattori H, Scheek LM, van Gent T, de Man FH, van der Laarse A, van Tol A. Decreased PLTP mass but elevated PLTP activity linked to insulin resistance in HTG: effects of bezafibrate therapy. *J Lipid Res* 2003;44:1462-9.

Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:965-71.

K

Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S, Kim SP, Van Citters GW, Dea MK, Bergman RN. Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E454-61.

Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW. Reduced beta-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am J Physiol* 1999;277:E659-67.

Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003;278:36091-8.

Kaser S, Sandhofer A, Holzl B, Gander R, Ebenbichler CF, Paulweber B, Patsch JR. Phospholipid and cholesteryl ester transfer are increased in lipoprotein lipase deficiency. *J Intern Med* 2003;253:208-16.

Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 2005;1:121-31.

Kern F Jr. Normal plasma cholesterol in an 88-year-old man who eats 25 eggs a day. Mechanisms of adaptation. *N Engl J Med* 1991;324:896-9.

Kesaniemi YA, Miettinen TA. Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest* 1987;17:391-5.

Klett EL, Lu K, Kusters A, Vink E, Lee MH, Altenburg M, Shefer S, Batta AK, Yu H, Chen J, Klein R, Looije N, Oude-Elferink R, Groen AK, Maeda N, Salen G, Patel SB. A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med* 2004;2:5.

Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997;387:414-7.

Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 1997;38:191-205.

Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999;96:329-39.

Kumar NS, Mansbach CM 2nd. Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization. *Am J Physiol* 1999;276:G378-86.

Kylin E. Studien. Hypertonie-Hyperglykamie-Hyperurikamiesyndrome. *Zentralblatt für innere Medizin* 1923 ;44.

L

Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, Barrett PH, Lewis GF. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest* 1999;103:1191-9.

Lambert G, Amar MJ, Guo G, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ, Sinal CJ. The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2003;278:2563-70.

Lammert F, Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology* 2005;129:718-734.

Lee J, Tauscher A, Seo DW, Oram JF, Kuver R. Cultured gallbladder epithelial cells synthesize apolipoproteins A-I and E. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G630-41.

Lee RG, Willingham MC, Davis MA, Skinner KA, Rudel LL. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *J Lipid Res* 2000;41:1991-2001.

Lee RG, Kelley KL, Sawyer JK, Farese RV Jr, Parks JS, Rudel LL. Plasma cholesteryl esters provided by lecithin:cholesterol acyltransferase and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 have opposite atherosclerotic potential. *Circ Res* 2004;95:998-1004.

Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10878-82.

Leray V, Gayet C, Martin L, Dumon H, Siliart B, Nguyen P. Modulation of uncoupling protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipose tissue in obese insulin-resistant dogs. *J Nutr* 2004;**134**:2154S-2157S.

Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2002;**277**:16470-7.

Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, Heatherington AC, Honig MA, Szeto LW, Barrett PH. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res* 1997;**38**:1771-8.

Lewis GF, Naples M, Uffelman K, Leung N, Szeto L, Adeli K. Intestinal lipoprotein production is stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in the fasting state: studies in insulin-resistant and insulin-sensitized Syrian golden hamsters. *Endocrinology* 2004;**145**:5006-12.

Lewis GF, Murdoch S, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Albers A, Adeli K, Brunzell JD. Hepatic lipase mRNA, protein, and plasma enzyme activity is increased in the insulin-resistant, fructose-fed Syrian golden hamster and is partially normalized by the insulin sensitizer rosiglitazone. *Diabetes* 2004;**53**:2893-900.

Lewis GF, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Haidari M, Adeli K. Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster. *Endocrinology* 2005;**146**:247-55.

Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005;**96**:1221-32.

Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Valledor AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* 2004;**114**:1564-76.

Liao W, Chan L. Apolipoprotein B, a paradigm for proteins regulated by intracellular degradation, does not undergo intracellular degradation in CaCo2 cells. *J Biol Chem* 2000;275:3950-6.

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. *J Lipid Res* 1990;31:1693-701.

Lin DS, Connor WE. The long term effects of dietary cholesterol upon the plasma lipids, lipoproteins, cholesterol absorption, and the sterol balance in man: the demonstration of feedback inhibition of cholesterol biosynthesis and increased bile acid excretion. *J Lipid Res* 1980;21:1042-52.

Lin MC, Arbeeny C, Bergquist K, Kienzle B, Gordon DA, Wetterau JR. Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides. *J Biol Chem* 1994;269:29138-45.

Lin S, Lu X, Chang CC, Chang TY. Human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase expressed in chinese hamster ovary cells: membrane topology and active site location. *Mol Biol Cell* 2003;14:2447-60.

Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee

K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltsen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005;438:803-19.

Lionetti V, Linke A, Chandler MP, Young ME, Penn MS, Gupte S, d'Agostino C, Hintze TH, Stanley WC, Recchia FA. Carnitine palmitoyl transferase-I inhibition prevents ventricular remodeling and delays decompensation in pacing-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 2005 ;66:454-61.

Liu LP, Tilly LP, Tappe JP, Fox PR. Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). *J Am Vet Med Assoc* 1986;198:227-32.

Liu GL, Fan LM, Redinger RN. The association of hepatic apoprotein and lipid metabolism in hamsters and rats. *Comp Biochem Physiol A* 1991;99:223-8.

Liu S, Tilly LP, Tappe JP, Fox PR. Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis:21 cases (1970-1983). *J Am Vet Med Assoc* 1986;198:227-32.

Ljung B, Bamberg K, Dahllof B, Kjellstedt A, Oakes ND, Ostling J, Svensson L, Camejo G. AZ 242, a novel PPARalpha/gamma agonist with beneficial effects on insulin resistance and carbohydrate and lipid metabolism in ob/ob mice and obese Zucker rats. *J Lipid Res* 2002;43:1855-63.

Lowe ME. The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res* 2002;43:2007-16.

Lu S, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, Gallagher JW, Shelness GS, Morris GS, Mahan J, Frase S, Mansbach CM, Weinberg RB, Black DD. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* 2005; [Epub ahead of print].

Luc G. Mechanisms of action of hypolipidemic agents. *Thérapie* 2000;55:661-668.

Lundasen T, Liao W, Angelin B, Rudling M. Leptin induces the hepatic high density lipoprotein receptor scavenger receptor B type I (SR-BI) but not cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) in leptin-deficient (ob/ob) mice. *J Biol Chem* 2003;278:43224-8.

Luo CC, Li WH, Chan L. Structure and expression of dog apolipoprotein A-I, E, and C-I mRNAs: implications for the evolution and functional constraints of apolipoprotein structure. *J Lipid Res* 1989;30:1735-46.

M

Maheux P, Azhar S, Kern PA, Chen YD, Reuven GM. Relationship between insulin-mediated glucose disposal and regulation of plasma and adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia* 1997;40:850-8.

Mahley RW, Weisgraber KH. Canine lipoproteins and atherosclerosis. I. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ Res* 1974;35:713-21.

Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM, Edwards PA. Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res* 2002;43:2037-41.

Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Edwards PA. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002;277:31900-8.

Maldonado EN, Romero JR, Ochoa B, Avelano MI. Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001;128:719-29.

Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, Mousavi A, Gjoen T, Berg T. Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:557-65.

Maheux P, Azhar S, Kern PA, Chen YD, Reuven GM. Relationship between insulin-mediated glucose disposal and regulation of plasma and adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia* 1997;40:850-8.

Mahley RW, Weisgraber KH. Canine lipoproteins and atherosclerosis. I. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ Res* 1974;35:713-21.

Malik S. Transcriptional regulation of the apolipoprotein AI gene. *Front Biosci* 2003;8:d360-8.

Mamo JC, Watts GF, Barrett PH, Smith D, James AP, Pal S. Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity: an effect of reduced LDL receptor expression? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E626-32.

Maragandakis M, Hankin H. On the mode of action of lipid lowering agents, V : kinetics of the inhibition in vitro of rat acetyl-coA carboxylase. *J Biol Chem* 1971;246:348-54.

Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE, Rigotti A. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170-80.

Mardones P, Pilon A, Bouly M, Duran D, Nishimoto T, Arai H, Kozarsky KF, Altayo M, Miquel JF, Luc G, Clavey V, Staels B, Rigotti A. Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J Biol Chem* 2003;278:7884-90.

Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-Fruchart J, Glineur C, Staels B. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* 2001;107:1423-32.

Martins IJ, Redgrave TG. Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine? *J Nutr Biochem* 2004;15:130-41.

Massaro ER, Zilversmit DB. Controlling factors in the maintenance of plasma cholesterol concentration in the rabbit. *J Nutr* 1977;107:596-605.

Matsuhisa M, Shi ZQ, Wan C, Lekas M, Rodgers CD, Giacca A, Kawamori R, Vranic M. The effect of pioglitazone on hepatic glucose uptake measured with indirect and direct methods in alloxan-induced diabetic dogs. *Diabetes* 1997;46:224-31.

Maugeais C, Tietge UJ, Broedl UC, Marchadier D, Cain W, McCoy MG, Lund-Katz S, Glick JM, Rader DJ. Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation* 2003;108:2121-6.

McFarlane AS. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 1958;182:53.

McGill HC Jr, Mott GE, Lewis DS, McMahan CA, Jackson EM. Early determinants of adult metabolic regulation: effects of infant nutrition on adult lipid and lipoprotein metabolism. *Nutr Rev* 1996;54:S31-40.

McKenney J, Ballantyne CM, Feldman TA, Brady WE, Shah A, Davies MJ, Palmisano J, Mitchel YB. LDL-C goal attainment with ezetimibe plus simvastatin coadministration vs atorvastatin or simvastatin monotherapy in patients at high risk of CHD. *MedGenMed* 2005;7:3.

McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4245-50.

Mekki N, Christofilis MA, Charbonnier M, Atlan-Gepner C, Defoort C, Juhel C, Borel P, Portugal H, Pauli AM, Vialettes B, Lairon D. Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:184-91.

Melchior GW, Mahley RW, Buckhold DK. Chylomicron metabolism during dietary-induced hypercholesterolemia in dogs. *J Lipid Res* 1981;22:598-609.

Melchior GW, Harwell JF. Cholesterol absorption and turnover in hypercholesterolemic dogs. *J Lipid Res* 1985;26:306-15.

Miettinen TA. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* 1980;10:27-35.

Miettinen TA, Gylling H. Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis* 2000;153:241-8.

Miettinen TA, Gylling H, Lindbohm N, Miettinen TE, Rajaratnam RA, Relas H; Finnish Treat-to-Target Study Investigators. Serum noncholesterol sterols during inhibition of cholesterol synthesis by statins. *J Lab Clin Med* 2003;141:131-7.

Mittendorfer B, Ostlund RE Jr, Patterson BW, Klein S. Orlistat inhibits dietary cholesterol absorption. *Obes Res* 2001;9:599-604.

Monroe P, Vlahcevic ZR, Swell L. In vivo evaluation of lipoprotein cholesterol ester metabolism in patients with liver disease. *Gastroenterology* 1983;85:820-9.

Morel E, Demignot S, Chateau D, Chambaz J, Rousset M, Delers F. Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell* 2004;15:132-41.

Mott GE, DeLallo L, Driscoll DM, McMahan CA, Lewis DS. Influence of breast and formula feeding on hepatic concentrations of apolipoprotein and low-density lipoprotein receptor mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1993;1169:59-65.

Morton RE, Greene DJ. Suppression of lipid transfer inhibitor protein activity by oleate. A novel mechanism of cholesteryl ester transfer protein regulation by plasma free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3041-8.

Mu H, Høy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 2004;43:105-33.

Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem* 2003;278:13356-66.

Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconi F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1819-28.

Mykkanen L, Kuusisto J, Haffner SM, Laakso M, Austin MA. LDL size and risk of coronary heart disease in elderly men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2742-8.

N

Nagasawa M, Ide T, Suzuki M, Tsunoda M, Akasaka Y, Okazaki T, Mochizuki T, Murakami K. Pharmacological characterization of a human-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist in dogs. *Biochem Pharmacol* 2004;67:2057-69.

Nakagawa-Toyama Y, Hirano K, Tsujii K, Nishida M, Miyagawa J, Sakai N, Yamashita S. Human scavenger receptor class B type I is expressed with cell-specific fashion in both initial and terminal site of reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2005;183:75-83.

Nagashima K, Lopez C, Donovan D, Ngai C, Fontanez N, Bensadoun A, Fruchart-Najib J, Holleran S, Cohn JS, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005;115:1323-32.

Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Pharmacological Activation of Liver X Receptors Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation* 2005; [Epub ahead of print].

Negro R, Mangieri T, Dazzi D, Pezzarossa A, Hassan H. Rosiglitazone effects on blood pressure and metabolic parameters in nondipper diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;70:20-5.

Nemoto S, Razeghi P, Ishiyama M, De Freitas G, Taegtmeier H, Carabello BA. PPAR-gamma agonist rosiglitazone ameliorates ventricular dysfunction in experimental chronic mitral regurgitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H77-82.

Ness GC, Chambers CM, Lopez D. Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity. *J Lipid Res* 1998;39:75-84.

Niwa M, Rashid S, Shum K, Mathoo JM, Chan O, Tchipashvili V, Kawamori R, Vranic M, Giacca A. Effect of JTT-501 on net hepatic glucose balance and peripheral glucose uptake in alloxan-induced diabetic dogs. *Metabolism* 2000;49:862-7.

O

Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5306-11.

Ooi TC, Ooi DS. The atherogenic significance of an elevated plasma triglyceride level. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998;35:489-516.

Ooi EM, Watts GF, Farvid MS, Chan DC, Allen MC, Zilko SR, Barrett PH. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in obesity. *Obes Res* 2005;13:1008-16.

Oram JF, Wolfbauer G, Vaughan AM, Tang C, Albers JJ. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J Biol Chem* 2003;278:52379-85.

Ory DS. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ Res* 2004;95:660-70.

Ouguerram K, Krempf M, Maugeais C, Maugere P, Darmaun D, Magot T. A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism* 2002;51:5-11.

Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E, Magot T. Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity; An in vivo approach using stable isotopes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;138:339-45.

Owens D. The extended postprandial phase in diabetes. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1085-9.

P

Parhofer KG, Hugh P, Barrett R, Bier DM, Schonfeld G. Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes. *J Lipid Res* 1991;32:1311-23.

Parhofer KG, Laubach E, Barrett PH. Effect of atorvastatin on postprandial lipoprotein metabolism in hypertriglyceridemic patients. *J Lipid Res* 2003;44:1192-8.

Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:571-5.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;93:693-704.

Pertsemlidis DE, Kirchman EH, Ahrens EH Jr. Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. *J Clin Invest* 1973;52:2353-67.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:165-9.

Phillips C, Owens D, Collins P, Tomkin GH. Microsomal triglyceride transfer protein: does insulin resistance play a role in the regulation of chylomicron assembly? *Atherosclerosis* 2002;160:355-60.

Phillips C, Mullan K, Owens D, Tomkin GH. Intestinal microsomal triglyceride transfer protein in type 2 diabetic and non-diabetic subjects: The relationship to triglyceride-rich postprandial lipoprotein composition. *Atherosclerosis* 2005; [Epub ahead of print]

Pihlajamaki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res* 2004;45:507-12.

Plat J, van Onselen EN, van Heugten MM, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat-soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:671-677.

Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res* 2005;46:2468-76.

Pont F, Duvillard L, Florentin E, Gambert P, Verges B. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in obese insulin resistant patients. An in vivo stable isotope study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1151-8.

Ponz de Leon M, Loria P, Iori R, Carulli N. Cholesterol absorption in cirrhosis: the role of total and individual bile acid pool size. *Gastroenterology* 1981;80:1428-37.

Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hammerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:471-81.

Proctor SD, Vine DF, Mamo JC. Arterial retention of apolipoprotein B(48)- and B(100)-containing lipoproteins in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:461-70.

Q

Quintao E, Grundy SM, Ahrens EH Jr. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res* 1971;12:233-47.

Qiu W, Taghibiglou C, Avramoglu RK, Van Iderstine SC, Naples M, Ashrafpour H, Mhapsekar S, Sato R, Adeli K. Oleate-mediated stimulation of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene promoter: implications for hepatic MTP overexpression in insulin resistance. *Biochemistry* 2005;44:3041-9.

R

Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J, Clerc M, Dumon MF, Fairwell T, Zech L. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. *J Clin Invest* 1994;93:321-30.

Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 2003;111:1795-803.

Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, Kotite L, Kunitake ST, Havel RJ, Kane JP. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1767-74.

Rashid S, Uffelman KD, Barrett PH, Vicini P, Adeli K, Lewis GF. Triglyceride enrichment of HDL does not alter HDL-selective cholesteryl ester clearance in rabbits. *J Lipid Res* 2001;42:265-71.

Rashid S, Uffelman KD, Barrett PHR, Lewis GF. Effect of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I production and clearance in the New Zealand white rabbit. *Circulation* 2002;106:2955-60.

Rashid S, Trinh DK, Uffelman KD, Cohn JS, Rader DJ, Lewis GF. Expression of human hepatic lipase in the rabbit model preferentially enhances the clearance of triglyceride-enriched versus native high-density lipoprotein apolipoprotein A-I. *Circulation* 2003;107:3066-72.

Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem* 2003;36:421-9.

Redgrave TG. Cholesterol feeding alters the metabolism of thoracic-duct lymph lipoprotein cholesterol in rabbits but not in rats. *Biochem J* 1973;136:109-13.

Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P, Brewer HB Jr. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12685-90.

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289:1524-9.

Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002;277:18793-800.

Repa JJ, Buhman KK, Farese RV Jr, Dietschy JM, Turley SD. ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology* 2004;40:1088-97.

Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 1998;41:929-34.

Roberts CK, Liang K, Barnard RJ, Kim CH, Vaziri ND. HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X. *Kidney Int* 2004;66:1503-11.

Rocchini AP, Yang JQ, Gokee A. Hypertension and insulin resistance are not directly related in obese dogs. *Hypertension* 2004;43:1011-6.

Rojas FA, Hirata AE, Saad MJ. Regulation of insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation in animal models of insulin resistance. *Endocrine* 2003;21:115-22.

Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4171-5.

Root C, Smith CD, Sundseth SS, Pink HM, Wilson JG, Lewis MC. Ileal bile acid transporter inhibition, CYP7A1 induction, and antilipemic action of 264W94. *J Lipid Res* 2002;43:1320-30.

Rothblat GH, Bamberger M, Phillips MC. Reverse cholesterol transport. *Methods Enzymol* 1986;129:628-44.

Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991;353:265-7.

Rudel LL, Lee RG, Parini P. ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1112-8.

Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 1998;47:699-713.

Rye KA, Jauhiainen M, Barter PJ, Ehnholm C. Triglyceride-enrichment of high density lipoproteins enhances their remodelling by phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 1998 Mar;39:613-22.

S

Saito M, Eto M, Kaku K. Remnant-like lipoprotein particles in type 2 diabetic patients with apolipoprotein E3/3 and apolipoprotein E2 genotypes. *Metabolism* 2002;51:964-9.

Sako T, Takahashi T, Takehana K, Uchida E, Nakade T, Umemura T, Taniyama H. Chlamydial infection in canine atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2002;162:253-9.

Satoh A, Adachi H, Tsuruta M, Hirai Y, Hiratsuka A, Enomoto M, Furuki K, Hino A, Takeuchi T, Imaizumi T. High plasma level of remnant-like particle cholesterol in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2005;28:2514-8.

Samuel P, Crouse JR, Ahrens EH Jr. Evaluation of an isotope ratio method for measurement of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 1978;19:82-93.

Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:2831-8.

Schwartz CC, Berman M, Vlahcevic ZR, Halloran LG, Gregory DH, Swell L. Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites. *J Clin Invest* 1978;61:408-23.

Schwartz CC, Vlahcevic ZR, Berman M, Meadows JG, Nisman RM, Swell L. Central role of high density lipoprotein in plasma free cholesterol metabolism. *J Clin Invest* 1982 Jul;70(1):105-16.

Schwartz CC, Zech LA, VandenBroek JM, Cooper PS. Cholesterol kinetics in subjects with bile fistula. Positive relationship between size of the bile acid precursor pool and bile acid synthetic rate. *J Clin Invest* 1993;91:923-38.

Schwartz CC, VandenBroek JM, Cooper PS. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *J Lipid Res* 2004;45:1594-607.

Sehayek E, Ono JG, Shefer S, Nguyen LB, Wang N, Batta AK, Salen G, Smith JD, Tall AR, Breslow JL. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10194-9.

Serisier S, Briand F, Ouguerram K, Magot T, Nguyen P. Fenofibrate lowers lipid parameters in obese dog. *J Nutr* 2006; *sous presse*.

Shi GQ, Dropinski JF, McKeever BM, Xu S, Becker JW, Berger JP, MacNaul KL, Elbrecht A, Zhou G, Doebber TW, Wang P, Chao YS, Forrest M, Heck JV, Moller DE, Jones AB. Design and synthesis of alpha-aryloxyphenylacetic acid derivatives: a novel class of PPARalpha/gamma dual agonists with potent antihyperglycemic and lipid modulating activity. *J Med Chem* 2005;48:4457-68.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000;6:77-86.

Simonen PP, Gylling HK, Miettinen TA. Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity. *Diabetes Care* 2002;25:1511-5.

Singh K, Batuman OA, Akman HO, Kedeas MH, Vakil V, Hussain MM. Differential, tissue-specific, transcriptional regulation of apolipoprotein B secretion by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 2002;277:39515-24.

Skrumsager BK, Nielsen KK, Muller M, Pabst G, Drake PG, Edsberg B. Ragaglitazar: the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of a novel dual PPAR alpha and

gamma agonist in healthy subjects and patients with type 2 diabetes. *J Clin Pharmacol* 2003;43:1244-56.

Slight I, Bendayan M, Malo C, Delvin E, Lambert M, Levy E. Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane. *Exp Cell Res* 2004;300:11-22.

Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;47:507-14.

Stange EF, Dietschy JM. Cholesterol absorption and metabolism by the intestinal epithelium. In: Danielsson H, Sjövall, editors. Sterols and bile acids. New York: Elsevier Science Publishers 1985:121-149.

Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 2004;53:235-43.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998;98:2088-93.

Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994;94:1172-9.

Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haeften T, Renn W, Gerich J. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:295-301.

Sudhop T, Lutjohann D, von Bergmann K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Ther* 2005;105:333-41.

Sukhova GK, Williams JK, Libby P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1452-8.

Sumner AE, Vega GL, Genovese DJ, Finley KB, Bergman RN, Boston RC. Normal triglyceride levels despite insulin resistance in African Americans: role of lipoprotein lipase. *Metabolism* 2005;54:902-9.

Sunayama S, Watanabe Y, Daida H, Yamaguchi H. Thiazolidinediones, dyslipidaemia and insulin resistance syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:397-402.

Svedberg J, Bjorntorp P, Smith U, Lonnroth P. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1990;39:570-4.

Swift LL, Jovanovska A, Kakkad B, Ong DE. Microsomal triglyceride transfer protein expression in mouse intestine. *Histochem Cell Biol* 2005;123:475-82.

Sylvén C, Borgström B. Absorption and lymphatic transport of cholesterol in the rat. *J Lipid Res* 1968;9:596-601.

T

Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem* 2002;277:793-803.

Tall AR, Green PH, Glickman RM, Riley JW. Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. *J Clin Invest* 1979;64:977-89.

Tan KC, Cooper MB, Ling KL, Griffin BA, Freeman DJ, Packard CJ, Shepherd J, Hales CN, Betteridge DJ. Fasting and postprandial determinants for the occurrence of small dense LDL species in non-insulin-dependent diabetic patients with and without hypertriglyceridaemia:

the involvement of insulin, insulin precursor species and insulin resistance. *Atherosclerosis* 1995;113:273-87.

Taskinen MR. Insulin resistance and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:153-60.

Tato F, Vega GL, Grundy SM. Determinants of plasma HDL-cholesterol in hypertriglyceridemic patients. Role of cholesterol-ester transfer protein and lecithin cholesteryl acyl transferase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Jan;17(1):56-63.

Tauscher A, Kuver R. ABCG5 and ABCG8 are expressed in gallbladder epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:1021-8.

Thuahnai ST, Lund-Katz S, Williams DL, Phillips MC. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J Biol Chem* 2001;276:43801-8.

Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 1986;43:92-7.

Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brunham LR, Mulya A, Gebre AK, Coutinho JM, Colvin PL, Smith TL, Hayden MR, Maeda N, Parks JS. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115:1333-42.

Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU, Steineger HH, Andresen SM, Gustafsson JA, Nebb HI. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 2002;277:10691-7.

Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 2000;247:425-31.

Tornvall P, Olivecrona G, Karpe F, Hamsten A, Olivecrona T. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1086-93.

Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:245-54.

Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003;52:2882-7.

Tsutsumi K, Hagi A, Inoue Y. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol Pharm Bull* 2001;24:579-81.

Turley SD, Herndon MW, Dietschy JM. Reevaluation and application of the dual-isotope plasma ratio method for the measurement of intestinal cholesterol absorption in the hamster. *J Lipid Res* 1994;35:328-39.

Turley SD, Dietschy JM. Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:233-240.

U

Umeh OC, Currier JS. Lipids, metabolic syndrome, and risk factors for future cardiovascular disease among HIV-infected patients. *Curr HIV/AIDS Rep* 2005;2:132-9.

V

Vague J. La différenciation sexuelle facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Med* 1947;55:339-340.

van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC, Hauser H. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry* 2005;44(11):4517-25.

van der Steeg WA, Kuivenhoven JA, Klerkx AH, Boekholdt SM, Hovingh GK, Kastelein JJ. Role of CETP inhibitors in the treatment of dyslipidemia. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:631-6.

Van Eck M, Bos IS, Hildebrand RB, Van Rij BT, Van Berkel TJ. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am J Pathol* 2004;165:785-94.

van Wijk JP, de Koning EJ, Castro Cabezas M, Rabelink TJ. Rosiglitazone improves postprandial triglyceride and free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:844-9.

Vanstone CA, Jones PJ. Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 2004;79:340-1.

Vaughan CJ, Gotto AM Jr. Update on statins: 2003. *Circulation* 2004;110:886-92.

Vega GL, von Bergmann K, Grundy SM, Beltz W, Jahn C, East C. Increased catabolism of VLDL-apolipoprotein B and synthesis of bile acids in a case of hypobetalipoproteinemia. *Metabolism* 1987;36:262-9.

Vega-Lopez S, Freake HC, Fernandez ML. Sex and hormonal status modulate the effects of psyllium on plasma lipids and monocyte gene expression in humans. *J Nutr* 2003;133:67-70.

Villa E, Gonzalez-Albarran O, Rabano A, Garcia-Robles R. Effects of hyperinsulinemia on vascular blood flows in experimental obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:273-9.

Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999;103:931-43.

W

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2005;27:1487-95.

Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 1985;75:384-90.

Wang CS, Hartsuck J, Mc Conathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1992;1123:1-17.

Wang DQ, Carey MC. Measurement of intestinal cholesterol absorption by plasma and fecal dual-isotope ratio, mass balance, and lymph fistula methods in the mouse: an analysis of direct versus indirect methodologies. *J Lipid Res* 2003;44:1042-59.

Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9774-9.

Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. *J Biol Chem* 2005;280:35896-903.

Watts GF, Barrett PH, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD, Loehrer F, Johnson AG. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes* 2003;52:803-11.

Welty FK, Lichtenstein AH, Barrett PH, Dolnikowski GG, Ordovas JM, Schaefer EJ. Decreased production and increased catabolism of apolipoprotein B-100 in apolipoprotein B-67/B-100 heterozygotes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:881-8.

Welty FK, Lichtenstein AH, Barrett PH, Dolnikowski GG, Schaefer EJ. Human apolipoprotein (Apo) B-48 and ApoB-100 kinetics with stable isotopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2966-74.

Wetterau JR, Zilversmit DB. Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chem Phys Lipids* 1985;38:205-22.

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

Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005;26:19-39.

Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:567-74.

Wierzbicki AS, Lumb PJ, Semra Y, Chik G, Christ ER, Crook MA. Atorvastatin compared with simvastatin-based therapies in the management of severe familial hyperlipidaemias. *QJM* 1999;92:387-94.

Wong L, Sivok B, Kurucz E, Sloop CH, Roheim PS, Asztalos B. Lipid composition of HDL subfractions in dog plasma and lymph. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1875-81.

Wright AS, Bauer JE, Bigley KE, Lees GE, Waldron MK. Maternal dietary fatty acids modify canine puppy plasma lipoprotein distributions during the suckling period. *J Nutr* 2004;134:2106S-9S.

Wu X, Zhou M, Huang LS, Wetterau J, Ginsberg HN. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:10277-81.

Y

Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; 46:1297-312.

Yarbrough WM, Spinale FG. Large animal models of congestive heart failure: a critical step in translating basic observations into clinical applications. *J Nucl Cardiol* 2003;10:77-86.

Young SC, Hui YD. Pancreatic lipase/colipase-mediated triacylglycerol hydrolysis is required for cholesterol transport from lipid emulsions to intestinal cells. *Biochem J* 1999;339:615-20.

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110:671-80.

Z

Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Sinnett D, Kalman R, Garofalo C, Seidman E, Levy E. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in *Psammomys obesus*: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:2539-45.

Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem* 2001;276:43018-24.

Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2005;115:2870-4.

Zilversmit DB. The composition and structure of lymph chylomicrons in dog, rat, and man. *J Clin Invest* 1965;44:1610-22.

Zilversmit DB. A single blood sample dual isotope method for the measurement of cholesterol absorption in rats. *Proc Soc Exp Bio Med* 1972;140:862-5.

Etude des effets de l'insulinorésistance et des traitements pharmacologiques sur l'absorption intestinale et le transport inverse du cholestérol chez le chien

Le chien a été utilisé en tant que modèle animal pour étudier les effets de l'insulinorésistance et des traitements pharmacologiques (atorvastatine et rosiglitazone) sur l'absorption intestinale et le transport inverse du cholestérol (TIC), deux cibles thérapeutiques potentielles pour prévenir les maladies cardiovasculaires.

Le pourcentage d'absorption intestinale du cholestérol a été mesuré en utilisant la méthode de Zilversmit. Chez le chien sain, l'atorvastatine induit un pourcentage d'absorption du cholestérol augmenté. En revanche, l'absorption intestinale du cholestérol est réduite en situation d'insulinorésistance. La re-sécrétion du cholestérol libre dans les chylomicrons est également diminuée en phase postprandiale. Malgré une moindre absorption du cholestérol, le chien insulinorésistant se caractérise par une hyperlipidémie, tant à jeun qu'en période postprandiale, avec une augmentation de la teneur en ester de cholestérol dans les chylomicrons. Cette hyperlipidémie peut être corrigée par la rosiglitazone qui restaure la sensibilité à l'insuline. Chez le chien insulinorésistant, les études cinétiques de l'apolipoprotéine (apo) A-I et des esters de cholestérol des HDL ont montré une altération du TIC, notamment à travers une baisse de la capture sélective des esters de cholestérol des HDL. Au contraire, l'atorvastatine stimulerait le TIC chez le chien sain, via un enrichissement des HDL en apo E qui favoriserait la liaison de ces particules à leur récepteur hépatique.

Comme chez l'homme, l'insulinorésistance induit chez le chien une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol, une hyperlipidémie (augmentation des acides gras libres, des triglycérides et de la teneur en esters de cholestérol dans les chylomicrons) et une altération du TIC (baisse de la capture sélective des esters de cholestérol des HDL).

L'ensemble de ces travaux confirme l'intérêt du chien pour l'étude du syndrome d'insulinorésistance et le développement de traitements pharmacologiques.

Mots-clés : lipoprotéines, cholestérol, absorption intestinale, insulinorésistance, HDL, chylomicron, chien, isotopes stables.

Effects of insulin resistance and pharmacological treatments on intestinal cholesterol absorption and reverse cholesterol transport in the dog

We used dog as an animal model to study the effects of insulin resistance and pharmacological treatment (atorvastatin and rosiglitazone) on intestinal cholesterol absorption and reverse cholesterol transport (RCT), two main therapeutic targets in cardiovascular disease prevention.

Percent cholesterol absorption was assessed using the Zilversmit method. Atorvastatin treatment increased intestinal cholesterol absorption in healthy dogs. Percent cholesterol absorption was lower in insulin resistant dogs. Resecretion of free cholesterol into chylomicron was significantly lower during postprandial phase in insulin resistant dogs. Although cholesterol absorption is lower, insulin resistant dogs are dyslipidemic in both fasted and postprandial state, with higher concentration of cholesteryl esters-enriched chylomicron. Dyslipidemia is improved with rosiglitazone treatment that increases insulin sensitivity. Kinetic studies of HDL apolipoprotein (apo) A-I and cholesteryl esters showed an impairment of RCT, through a decrease in HDL-cholesteryl esters selective uptake. Atorvastatin treatment would improve RCT in dog through an apo E enrichment of HDL, thereby resulting in a better binding to hepatic receptor.

As in humans, insulin resistance decreases intestinal cholesterol absorption and impairs lipid parameters (higher free fatty acids, triglycerides and cholesteryl esters-enriched chylomicron) and RCT (lower HDL-cholesteryl esters selective uptake) in the dog. These studies indicate that dog is a useful model to study insulin resistance and drug treatments.

Key words: lipoprotein, cholesterol, intestinal absorption, insulin resistance, HDL, chylomicron, dog, stable isotopes.

BRIAND François

INSERM U539-CHU Hôtel Dieu 3^{ème} Nord, 1 place Alexis Ricordeau
44093 NANTES