

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**Modulation pharmacologique (acide nicotinique) et
nutritionnelle (acides gras polyinsaturés oméga 3) du
transport inverse du cholestérol chez le chien obèse et
insulinorésistant**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Nutrition et Métabolisme

Présentée et soutenue publiquement par

Jérôme LE BLOC'H

Le 29 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Monsieur le Professeur Philippe Legrand, Rennes

Madame le Docteur Marianne Diez, Liège, Belgique

Président

Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard, Nantes

Examineurs

Madame le Docteur Isabelle Louveau, Saint-Gilles

Monsieur le Docteur Hassan Nazih, Nantes

Directeurs de thèse

Madame le Professeur Khadija Ouguerram, Nantes

Monsieur le Professeur Patrick Nguyen, Nantes

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

Differences in fatty acid composition and gene expression in the visceral and subcutaneous adipose tissues of nutritionally controlled dogs.

Le Bloc'h J., Leray V., Ouguerram K., Nguyen P.

Soumis à British Journal of Nutrition

Nicotinic acid decreases apoB100-containing lipoprotein levels by reducing hepatic VLDL secretion through a possible DGAT2 inhibition in obese dogs.

Le Bloc'h J., Leray V., Chétiveaux M., Freuchet B., Magot T., Krempf M., Nguyen P., Ouguerram K.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010 334(2): 583-589

Nicotinic acid accelerates HDL cholesteryl ester turnover in obese insulin resistant dogs.

Le Bloc'h J., Leray V., Nazih H., Serisier S., Zaman M.Q., Magot T., Krempf M., Nguyen P., Ouguerram K.

Soumis à European Journal of Pharmacology

EPA and DHA supplementation improves insulin sensitivity and dyslipidemia in obese and insulin resistant dogs.

Le Bloc'h J., Leray V., Durantou F., Ouguerram K., Nguyen P.

Soumis à Journal of nutrition

Kinetics aspects of energy intake, body weight gain and insulin sensitivity in dogs given a high-fat high-energy diet.

Le Bloch' J., Serisier S., Zaman M-Q, Leray V., Martin L., Dumon H., Magot T., Ouguerram K., Nguyen P.

En préparation.

Communications orales

Experimental Biology 2010 (Anaheim, CA, USA, 24-28 Avril 2010)

“Visceral and subcutaneous adipose tissues: variation in fatty acid composition and gene expression in nutritionally controlled dogs.”

Le Bloc’h J., Leray V., Martin L., Dumon H., Ouguerram K., Nguyen P

The European Society of Veterinary and comparative nutrition congress (Oristano, Italie, 15-17 Octobre 2009)

“Obese and insulin resistant dog model: does omega-3 fatty acid supplementation improve the disturbances associated with metabolic syndrome?”

Le Bloc’h J., Leray V., Durantou F., Gougnard A., Zaman M.Q., Martin L., Dumon H., Magot T., Ouguerram K., Nguyen P.

The European Society of Veterinary and comparative nutrition congress (Vienne, Autriche, 25-27 Septembre 2008)

“Kinetics aspects of energy intake, body weight gain and insulin sensitivity in dogs given a high-fat high-energy diet”

Le Bloc’h J., Serisier S., Zaman M.Q., Leray V., Martin L., Dumon H., Magot T., Ouguerram K., Nguyen P.

Waltham International Nutritional Sciences symposium (Cambridge, Angleterre, 16-18 Septembre 2010)

“Omega 3 fatty acids supplementation improves insulin sensitivity and increases EPA and DHA tissue content in obese and insulin resistant dogs”

Le Bloc’h J., Leray V., Zaman M-Q, Ouguerram K, Nguyen P.

Posters

Experimental Biology 2010 (Anaheim, CA, USA, 24-28 Avril 2010)

“Nicotinic acid improve reverse cholesterol transport in dogs”

Le Bloc’h J., Leray V., Magot T., Krempf M., Nguyen P., Ouguerram K.

6ème congrès du groupe d’étude et de recherché en lipidomique (Rennes, France, 1-3 Juillet 2009)

“Nicotinic acid impacts on reverse cholesterol transport in obese insulin resistant dogs”

Le Bloc’h J., Leray V., Nazih H., Serisier S., Zaman M.Q., Chétiveaux M., Magot T., Krempf M., Nguyen P., Ouguerram K.

Experimental Biology 2008 (San Diego, CA, USA, 5-9 avril 2008)

“Effect of nicotinic acid on plasma lipid and hepatic gene expression on obese insulin resistant dogs”

Le Bloc’h J., Leray V., Zaman M.Q., Serisier S., Ouguerram K., Nguyen P.

3ème congrès de la société française de nutrition (Lille, France. 6-7 Décembre 2007)

“L’acide nicotinique diminue les concentrations en triglycérides et cholestérol total sans affecter le HDL-cholestérol chez le chien obèse et insulino-résistant”

Le Bloc’h J., Zaman M.Q., Leray V., Serisier S., Ouguerram K., Nguyen P.

Table des matières

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. Rappels sur le métabolisme du cholestérol	5
I.1 Généralités sur les lipoprotéines	7
I.1.a Principales caractéristiques des lipoprotéines	7
I.1.a.i Situation chez l'homme	7
I.1.a.ii Situation chez le chien	9
I.1.b Les principales apolipoprotéines	11
I.1.b.i ApoB100 et apoB48	11
I.1.b.ii ApoA	13
I.1.b.iii Autres apolipoprotéines	14
I.2 Absorption intestinale du cholestérol et voie exogène	15
I.3 Voie endogène	17
I.4 Transport inverse du cholestérol (TIC)	19
I.4.a Formation des pré- β -HDL	19
I.4.a.i L'ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)	19
I.4.a.ii L'ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)	23
I.4.a.iii Le scavenger receptor-BI (SR-BI)	25
I.4.b Formation des α -HDL	25
I.4.c Remodelage des HDL	26
I.4.c.i La cholesteryl ester transfer protein (CETP)	26
I.4.c.ii La phospholipid transfer protein (PLTP)	27
I.4.c.iii La lipoprotein lipase (LPL)	28
I.4.c.iv La lipase hépatique (HL)	29
I.4.c.v La lipase endothéliale (EL)	29
I.4.d Catabolisme des HDL	31
I.4.d.i Capture sélective	31
I.4.d.ii Retour au foie via les lipoprotéines à apoB	32
I.4.d.iii Endocytose des HDL	32

La chaîne β de l' <i>ATP synthase</i>	33
Le complexe cubiline/mégaline	33
I.4.d.iv Le transintestinal cholesterol excretion (TICE)	34
II. Perturbations métaboliques et cellulaires associées à l'obésité.....	37
II.1 Le syndrome métabolique : définition et incidence	37
II.1.a L'obésité	37
II.1.b Le syndrome métabolique	37
II.2 Physiopathologie de l'insulinorésistance (IR).....	39
II.2.a Voie normale de la signalisation de l'insuline.....	41
II.2.b Pathogenèse de l'insulinorésistance	41
II.2.b.i Acides gras non estérifiés (AGNE) et tumor necrosis factor α (TNF α).....	41
II.2.b.ii Adiponectine et autres adipocytokines	43
II.3 La dyslipidémie associée à l'insulinorésistance	45
II.3.a Effets sur les lipoprotéines à apoB100	45
II.3.b Effets sur le transport inverse du cholestérol.....	47
II.3.b.i Efflux de cholestérol et insulinorésistance.....	47
II.3.b.ii Remodelage des HDL et insulinorésistance.....	47
La <i>lecithin : cholesterol acyltransferase</i> (LCAT).....	47
La <i>lipoprotein lipase</i> (LPL)	48
La lipase hépatique (HL).....	48
La <i>cholesterol ester transfer protein</i> (CETP)	48
La <i>phospholipid transfer protein</i> (PLTP)	48
II.3.b.iii Catabolisme des HDL et insulinorésistance.....	48
II.4 Situation chez le chien.....	49
II.4.a Mise en place de l'obésité et de l'insulinorésistance	49
II.4.b Conséquences métaboliques de l'insulinorésistance chez le chien.....	50
II.4.b.i La dyslipidémie associée à l'obésité chez le chien	50
II.4.b.ii Autres perturbations associées à l'obésité chez le chien.....	52
III. Modulation de la dyslipidémie par des facteurs nutritionnels ou pharmacologiques.....	53
III.1 L'acide nicotinique (AN).....	53
III.1.a Données cliniques.....	53
III.1.b Effets et mécanisme d'action.....	55
III.1.b.i Le récepteur GPR109A.....	55

III.1.b.ii	AN et AGNE.....	57
III.1.b.iii	AN et lipoprotéines à apoB100.....	57
III.1.b.iv	AN et TIC	59
III.2	Les acides gras polyinsaturés oméga 3	60
III.2.a	Généralités : nomenclature, apports et métabolisme	60
III.2.b	Rôles physiologiques.....	61
III.2.b.i	Au sein des membranes plasmiques.....	61
III.2.b.ii	Régulation de l'expression génique	63
<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> : PPAR.....	64	
<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i> : SREBP	64	
Autres récepteurs nucléaires : LXR, RXR, FXR et HNF-4 α	65	
III.2.b.iii	Rôle dans l'inflammation.....	66
Synthèse des eicosanoïdes	67	
Les cytokines pro-inflammatoires.....	69	
Les espèces réactives à l'oxygène.....	69	
III.2.c	Acides gras polyinsaturés oméga 3 et syndrome métabolique	69
III.2.c.i	Effets des acides gras ω 3 sur l'IR	69
III.2.c.ii	Effets des acides gras ω 3 sur la dyslipidémie	70
TG et lipoprotéines à apoB100	70	
Transport inverse du cholestérol.....	71	
OBJECTIFS		73
TRAVAUX PERSONNELS		76
I.	Suivi cinétique de l'obésité chez des chiens soumis à un régime hyper-lipidique et hyper-énergétique	78
I.1	Introduction	78
I.2	Article 1	79
I.3	Discussion	96
II.	Variations métaboliques entre le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané	99
II.1	Introduction	99
II.2	Article 2.....	101
II.3	Discussion	129

III. Effets d'une supplémentation en EPA et DHA sur la dyslipidémie et la sensibilité à l'insuline chez le chien obèse et insulino-résistant	132
III.1 Introduction.....	132
III.2 Article 3	134
III.3 Discussion	170
IV. Effets de l'acide nicotinique sur le métabolisme des lipoprotéines à apoB100	174
IV.1 Introduction.....	174
IV.2 Article 4	176
IV.3 Discussion	184
V. Effets de l'acide nicotinique sur le transport inverse du cholestérol.....	186
V.1 Introduction.....	186
V.2 Article 5	188
V.3 Discussion	219
VI. Effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur le transport inverse du cholestérol.....	221
VI.1 Introduction.....	221
VI.2 Matériels et méthodes	223
VI.3 Résultats.....	227
VI.4 Discussion	231
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	233
BIBLIOGRAPHIE	245

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1	ATP binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP binding cassette transporter G1
AC	Adenylate cyclase
AcAc	Acétoacétate
ACAT	AcylCoA cholesterol acyltransferase
AGMI	Acide gras monoinsaturés
AGPI	Acide gras polyinsaturés
AGS	Acide gras saturés
AGNE	Acide gras non estérifié
Akt	protein kinase B
ALA	Acide α linoléinique
Apo	Apolipoprotéine
AN	Acide nicotinique
β-AR	Récepteur β adrénergique
β-OHB	β hydroxybutyrate
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CL	Cholestérol libre
CM	Chylomicrons
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
DHA	Acide docosahexaénoïque
EC	Cholestérol estérifié
EL	Lipase endothéliale
EPA	acide eicosapentaénoïque
FATP	Fatty acid transport protein
FXR	Farnesoid X receptor
HDL	High density lipoprotein
HNF-4α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
IDL	Intermediate density lipoprotein
IGF-1α	Insulin like growth factor 1 α

IKKβ	IkappaB kinase β
IMC	Indice de masse corporelle
IR	Insulinorésistance
IRS	Insulin receptor substrate
LCAT	Lecithin: cholesterol acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	LDL receptor
LH	Lipase hépatique
LHS	Lipase hormono-sensible
LPL	Lipoprotein lipase
LRAT	Lecithin retinol acyltransferase
LT	Leucotriène
LXR	Liver X receptor
MCV	Maladies cardiovasculaires
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
OMS	Organisation mondiale de la santé
PG	Prostaglandines
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKC	Protein kinase C
PL	Phospholipides
PLTP	Phospholipid transfer protein
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RXR	Retinoid X receptor
sdLDL	LDL petites et denses
SR-BI	Scavenger receptor class B type 1
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein 1c
TG	Triglycéride
TIC	Transport inverse du cholestérol
TICE	Trans-intestinal cholesterol excretion
TNFα	Tumor necrosis factor α
VLDL	Very low density lipoprotein

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine	6
Figure 2 : Densité des lipoprotéines canines	10
Figure 3 : Absorption intestinale des lipides et synthèse des chylomicrons	16
Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines chez l'homme, voies exogènes et endogènes	18
Figure 5 : Représentation schématique du transport inverse du cholestérol chez l'homme	20
Figure 6 : Efflux de cholestérol suivant le modèle de l'endocytose conjointe de l'apoAI et d'ABCA1 ...	22
Figure 7 : Représentation schématique de la réaction d'estérification du cholestérol par la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT)	24
Figure 8 : Catabolisme des HDL	30
Figure 9 : Répartition de la population française en fonction de l'IMC.....	36
Figure 10 : Schéma de la voie de signalisation de l'insuline	38
Figure 11 : Altération de la voie de signalisation de l'insuline en cas d'insulinorésistance	40
Figure 12 : Conséquences de l'insulinorésistance sur la synthèse intestinale de chylomicrons et sur la voie exogène du cholestérol	44
Figure 13 : Conséquences de l'insulinorésistance sur le métabolisme des lipoprotéines, voie endogène et transport inverse du cholestérol	46
Figure 14 : Effets de l'acide nicotinique sur les différentes sous-classes de LDL et HDL	54
Figure 15 : Effets métaboliques de l'acide nicotinique à doses pharmacologiques sur la lipase hormono-sensible	56
Figure 16 : Rôle physiologique potentiel du β -hydroxybutyrate et du récepteur GPR109A en période de jeûne	56
Figure 17 : Mode d'action supposé de l'acide nicotinique sur le métabolisme des LDL et HDL dans le foie	58
Figure 18 : Impact des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur différents facteurs de transcriptions impliqués dans la lipolyse et la lipogenèse	62
Figure 19 : Synthèse des dérivés eicosanoïdes à partir des acides gras polyinsaturés	68
Figure 20 : Concentration en cholestérol dans les différentes lipoprotéines après séparation sur FPLC avant et à la fin de la période de supplémentation	228
Figure 21 : Concentration en triglycérides dans les différentes lipoprotéines après séparation sur FPLC avant et à la fin de la période de supplémentation	229
Figure 22 : Expression relative des ARNm du PPAR α , de l'ABCA1 et du SR-BI avant et à la fin de la période de supplémentation	230

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques chez l'homme	6
Tableau 2 : Composition chimique des lipoprotéines plasmatiques de l'homme	8
Tableau 3 : Principales caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques du chien	8
Tableau 4 : Composition chimique des lipoprotéines plasmatiques du chien	8
Tableau 5 : Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines	12
Tableau 6 : Classification de l'état corporel en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC)	36
Tableau 7 : Comparaison des définitions du syndrome métabolique	38
Tableau 8 : Comparaison des effets de différents agents thérapeutiques sur le traitement des dyslipidémies	54
Tableau 9 : Effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur les différents facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la lipogenèse	62
Tableau 10 : Effets physiologiques des eicosanoïdes les plus courants	68
Tableau 11 : Poids, masse grasse, indice de sensibilité à l'insuline et concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol, acides gras non estérifiés, glucose et insuline avant et à la fin de la période de supplémentation en EPA et DHA	227
Tableau 12 : tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la 1 ^{ère} partie de cette thèse	235
Tableau 13 : tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la 2 ^{ème} partie de cette thèse	237

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la 1^{ère} cause de décès dans le monde. En effet, d'après l'organisation mondiale de la santé, on estime à 17,1 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 29% de la mortalité mondiale totale (statistiques 2004). Il s'agit de maladies multifactorielles dont l'une des causes majeures se situe dans un dérèglement du métabolisme des lipoprotéines. La dyslipidémie associée à l'obésité et à l'insulinorésistance semble être de plus en plus impliquée, principalement du fait d'un fort accroissement de l'incidence de l'obésité, particulièrement dans les pays industrialisés.

Cette dyslipidémie, caractérisée par des taux élevés de triglycérides et de cholestérol, ainsi que par une concentration plasmatique en HDL-cholestérol réduite, est particulièrement athérogène. En effet, l'hypertriglycéridémie, de même que l'hypercholestérolémie, sont maintenant reconnues comme facteurs indépendants du risque d'athérosclérose. De plus, de nombreuses études ont montré qu'il existe une corrélation négative entre le risque cardiovasculaire et la concentration en HDL-cholestérol, suggérant ainsi un rôle protecteur des HDL pouvant s'expliquer par leur forte implication dans le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, voie appelée transport inverse du cholestérol. Cette voie consiste en une prise en charge du cholestérol libre des cellules périphériques par les HDL suivi d'une estérification de celui-ci. Le cholestérol est ensuite capté par le foie soit de façon sélective, soit par la capture directe de la particule de HDL, ou encore après transfert par la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) vers VLDL et LDL puis capture hépatique de ces derniers.

Le transport inverse du cholestérol est l'une des cibles majeure des traitements des dyslipidémies, puisqu'on a montré qu'une baisse du LDL-cholestérol n'est pas suffisante à elle seule pour réduire le risque cardiovasculaire et qu'une hausse du HDL-cholestérol peut participer significativement à cette réduction. Actuellement, la CETP apparait comme une cible thérapeutique prometteuse dans la mesure où il semblerait qu'elle joue un rôle majeur lors de l'apparition de la dyslipidémie. En effet, la CETP permet le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et les LDL en échange de triglycérides. Du fait d'une hypertriglycéridémie, il y a, chez les patients obèses et insulinorésistants, une augmentation des échanges via la CETP, ce qui entraîne un enrichissement des VLDL et LDL en cholestérol et rend ces lipoprotéines plus athérogènes. En contrepartie, on observe un enrichissement des HDL en triglycérides. Ces HDL riches en triglycérides ont un catabolisme accéléré et leur concentration en est donc réduite. Cette situation, bien connue chez l'homme, s'est compliquée lorsque notre laboratoire a mis en

évidence une dyslipidémie semblable à celle de l'homme chez le chien obèse et insulino-résistant, alors même que le chien est une espèce dépourvue de CETP. De plus, les agents hypotriglycéridémifiants devraient entraîner, chez l'homme, une hausse du HDL-cholestérol consécutive à une réduction des échanges via la CETP, or ce n'est pas le cas de certaines de ces molécules.

Afin d'éclaircir l'implication de la CETP dans le métabolisme du cholestérol, et notamment son rôle dans la dyslipidémie associée à l'obésité et l'insulino-résistance, ce travail de thèse a eu pour objectif d'étudier, chez le chien obèse et insulino-résistant, les effets de deux agents hypotriglycéridémifiants naturels et possédant des effets différents sur le HDL-cholestérol. Nous avons premièrement étudié les effets de l'acide nicotinique, décrit comme favorisant une hausse du HDL-cholestérol. Ensuite, des chiens ont reçu une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga 3, réputés hypotriglycéridémifiants mais ne modifiant pas la concentration plasmatique en HDL-cholestérol.

Avant de présenter les résultats obtenus, il apparaît nécessaire de faire quelques rappels bibliographiques. Dans une première partie, nous aborderons le métabolisme du cholestérol dans son ensemble, en ciblant plus particulièrement le transport inverse du cholestérol. Ensuite, les conséquences métaboliques et cellulaires de l'obésité et de l'insulino-résistance seront présentées, notamment les perturbations du métabolisme des lipoprotéines. Enfin, la dernière partie traitera de l'acide nicotinique et des acides gras polyinsaturés oméga 3

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Rappels sur le métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols. Il est synthétisé principalement par le foie et l'intestin à hauteur de 500 mg par jour, mais est également apporté par l'alimentation à un niveau sensiblement identique. Il existe aussi un recyclage important du cholestérol au niveau intestinal. Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures. Il est également un précurseur de nombreuses molécules telles que la vitamine D3, les hormones stéroïdes (cortisol, corticostérone et aldostérone), les hormones sexuelles (progestérone, œstrogène et testostérone) ou encore les acides biliaires.

Du fait de son caractère hydrophobe, le transport du cholestérol dans le sang nécessite la formation de particules amphiphiles appelées lipoprotéines. Ce transport a été divisé en trois grandes voies. Premièrement, la voie exogène, qui se fait par l'intermédiaire de lipoprotéines appelées chylomicrons, permet le transport du cholestérol d'origine intestinale vers le foie. La deuxième voie a été dénommée voie endogène et permet la distribution vers l'ensemble de l'organisme du cholestérol synthétisé ou recyclé par le foie. Cette voie se caractérise par une synthèse hépatique de lipoprotéines riches en triglycérides, les VLDL. Ces triglycérides sont ensuite hydrolysés pour conduire à des lipoprotéines de plus petites tailles, les LDL. Ce sont les LDL qui sont reconnus et capturés par les cellules périphériques pour couvrir les besoins cellulaires en cholestérol. Enfin, le catabolisme du cholestérol ne peut se faire qu'au niveau hépatique. C'est pourquoi il existe une troisième voie de transport, permettant le retour du cholestérol cellulaire vers le foie, appelée transport inverse du cholestérol. Elle consiste en un efflux de cholestérol des cellules périphériques vers des lipoprotéines de haute densité appelée HDL. Le cholestérol des HDL est ensuite estérifié par la *lecithin:cholesterol acyltransferase* (LCAT) avant d'être capturé par le foie en vue de son élimination sous forme de sels biliaires.

L'importance de l'étude du transport plasmatique du cholestérol vient de l'implication de celui-ci dans les maladies cardiovasculaires, et notamment dans l'athérosclérose. En effet, en situation d'hypercholestérolémie, les LDL en grand nombre sont capturés par les macrophages situés dans la paroi des vaisseaux. Ces macrophages s'enrichissent en lipides, se transforment en

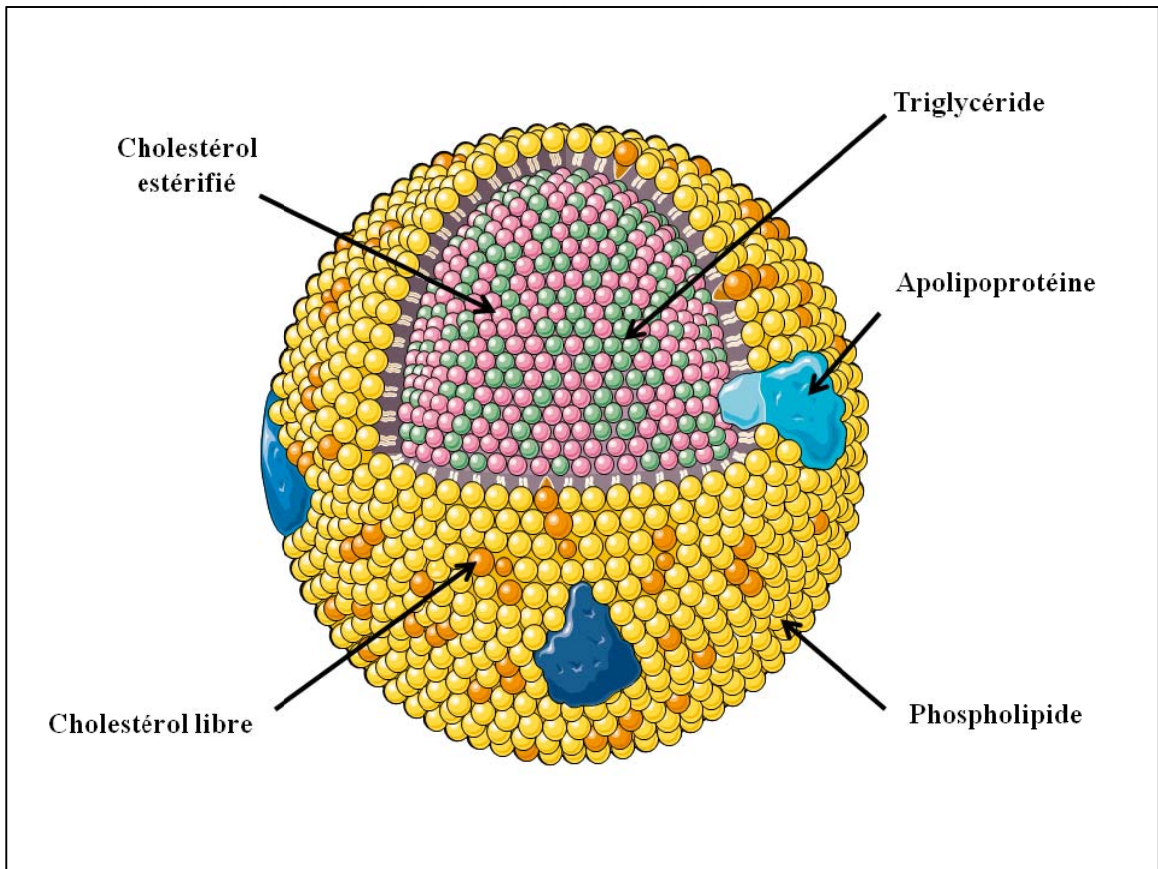


Figure 1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine.

Tableau 1 : Principales caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques chez l'homme (Gotto et al., 1986).

Lipoprotéines	Densité (g/mL)	Diamètre (Å)	Mobilité électrophorétique	Apolipoprotéines majeures
Chylomicrons	< 0,930	800-5000	Origine	B48, C, E
VLDL	0,930-1,006	300-400	Pré-β	B100, C, E
IDL	1,006-1,019	250-350	Pré-β, β	B100
LDL	1,019-1,063	200-250	β	AI, AII, E
HDL ₂	1,063-1,125	95-120	α	AI
HDL ₃	1,125-1,210	55-95	α	AI, E

cellules spumeuses et participent à l'apparition d'une plaque d'athérome, pouvant obstruer les vaisseaux et conduire à des incidents cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, etc.). Il est donc essentiel de bien connaître le métabolisme du cholestérol afin de proposer des approches thérapeutiques et/ou nutritionnelles visant à réduire la survenue de ces incidents cardiovasculaires.

I.1 Généralités sur les lipoprotéines

Les lipides (triglycérides, phospholipides, cholestérol) sont des molécules hydrophobes. Leur circulation dans le sang, milieu hydrophile, nécessite la formation de structures plus complexes appelées lipoprotéines, associant ces lipides et des protéines dénommées apolipoprotéines. Les lipoprotéines ont un rôle de transport des lipides du foie ou de l'intestin vers les cellules périphériques mais également de ces cellules périphériques vers le foie, lieu de leur catabolisme. Il s'agit de particules globulaires (figure 1) de haut poids moléculaire, présentant une monocouche périphérique hydrophile constituée de phospholipides (PL) et de cholestérol libre (CL), et un cœur hydrophobe formé de triglycérides (TG) et d'esters de cholestérol (EC). Les apolipoprotéines sont des molécules amphiphiles qui participent à la cohésion de l'ensemble.

Malgré des caractéristiques structurales communes, les lipoprotéines diffèrent profondément les unes des autres par la nature et la proportion de leurs constituants, le lieu de leur synthèse, leurs rôles biologiques et leurs métabolismes. En effet, les associations moléculaires non covalentes que forment les lipoprotéines subissent dans la circulation des remaniements permanents. Des échanges et des transferts ont lieu entre les lipoprotéines et les cellules mais également entre les différentes lipoprotéines.

I.1.a Principales caractéristiques des lipoprotéines

I.1.a.i Situation chez l'homme

Chez l'homme, les lipoprotéines sont classées en cinq groupes suivant leur densité (tableau 1). Par ordre croissant de densité on trouve : les chylomicrons (CM), les *Very Low*

Tableau 2 : Composition chimique des lipoprotéines plasmatiques de l'homme (Gotto et al., 1986).

Lipoprotéines	Composition chimique (% masse)				
	PR	PL	CL	CE	TG
Chylomicrons	2	5	1	2	90
VLDL	10	16	7	13	54
IDL	17	20	9	34	20
LDL	23	21	11	41	4
HDL ₂	42	35	5	13	5
HDL ₃	56	23	3	15	3

PR : protéines, PL : phospholipides, CL : cholestérol libre, CE : cholestérol estérifié, TG : triglycérides.

Tableau 3 : Principales caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques du chien (Mahley and Weisgraber, 1974).

Lipoprotéines	Densité (g/mL)	Diamètre (Å)	Mobilité électrophorétique	Apolipoprotéines majeures
Chylomicrons	< 0,960	900-3000	Origine	B48, C, E
VLDL	0,930-0,1006	260-900	Pré-β	B100, C, E
LDL	1,006-1,087	160-250	β	B100
HDL ₁	1,025-1,100	100-350	α	AI, AII, E
HDL ₂	1,070-1,100	55-85	α	AI
HDL _C	1,100-1,210	240-260	α	AI, E

Tableau 4 : Composition chimique des lipoprotéines plasmatiques du chien (Mahley and Weisgraber, 1974).

Lipoprotéines	Composition chimique (% masse)				
	PR	PL	CL	CE	TG
Chylomicrons	3	32	44 *		21
VLDL	14	10	6	2	68
LDL	27	28	5	17	23
HDL ₁	22	41	5	30	2
HDL ₂	43	36	5	15	1
HDL _C	12	37	10	40	1

PR : protéines, PL : phospholipides, CL : cholestérol libre, CE : cholestérol estérifié, TG : triglycérides

* : CE + CL

Density Lipoprotein (VLDL), les *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL), les *Low Density Lipoprotein* (LDL), lipoprotéines dominantes chez l'homme et les *High Density Lipoprotein* (HDL). De plus, il est également possible de différencier deux classes de HDL en fonction de leur densité : les HDL₂ et les HDL₃. L'augmentation de la densité des lipoprotéines est due à un appauvrissement en TG accompagnée d'un enrichissement en cholestérol.

Le tableau 2 présente la composition chimique des principales lipoprotéines plasmatiques humaines. Les CM et les VLDL sont surtout impliqués dans le transport des TG alors que les LDL et HDL se chargent essentiellement du transport du cholestérol. Les différences de composition s'expliquent par les rôles distincts joués par ces différentes lipoprotéines. Les CM sont responsables du transport des lipides alimentaires de l'intestin aux tissus. Les VLDL, synthétisées par le foie, participent à la voie endogène des lipoprotéines, transportant les TG du foie vers les tissus périphériques. Les IDL, issus de l'hydrolyse des TG des VLDL, participent aussi au transport des lipides vers les cellules périphériques. Les LDL, issues des IDL, constituent la dernière forme de lipoprotéine de la voie endogène après appauvrissement en TG. Enfin, les HDL sont les seules lipoprotéines permettant le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

1.1.a.ii Situation chez le chien

Chez le chien, quatre classes de lipoprotéines ont été identifiées. Les IDL, issues du catabolisme des VLDL, n'ont pour le moment pas été caractérisées. Il existe donc chez le chien les CM, présents uniquement en période post-prandiale, les VLDL, les LDL et les HDL (Mahley and Weisgraber, 1974). Comme chez l'homme, les HDL peuvent être séparés en deux sous-classes, HDL₁ et HDL₂, en fonction de leur densité (Mahley and Weisgraber, 1974). Il peut exister, uniquement après ingestion d'un régime hyper-lipidique et surtout hyper-cholestérolémique, une troisième classe d'HDL, appelée HDL_C, riche en cholestérol et en apolipoprotéine E et pauvre en apolipoprotéine AI (Mahley et al., 1974, Gordon et al., 1983). Ces lipoprotéines ne sont toutefois pas présentes chez le chien sain (Mahley and Weisgraber, 1974). Alors que les VLDL sont faiblement présentes, les HDL sont les lipoprotéines prédominantes chez le chien puisqu'elles représentent près de 85% du total des lipoprotéines (Mahley and Weisgraber, 1974, Chapman, 1986, Maldonado et al., 2001). Les principales caractéristiques

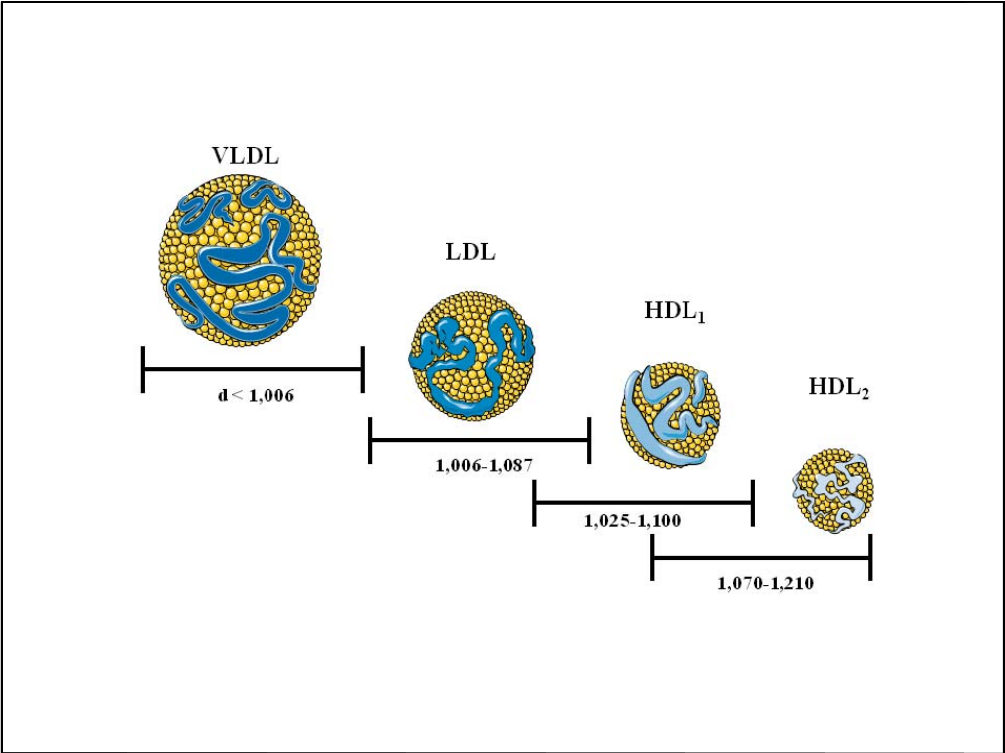


Figure 2 : Densité des lipoprotéines canines (Mahley and Weisgraber, 1974)

physicochimiques des lipoprotéines canines sont répertoriées dans les tableaux 3 et 4. Une caractéristique importante de ces lipoprotéines est le chevauchement de la gamme de densité des LDL et des HDL qui rend difficile leur séparation par des méthodes classiques basées sur la densité (figure 2). (Mahley and Weisgraber, 1974, Barrie et al., 1993).

I.1.b Les principales apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (apo) sont des protéines amphiphiles dont la partie hydrophobe pénètre à l'intérieur du cœur hydrophobe de la lipoprotéine alors que la partie hydrophile se situe en surface de la particule. De ce fait, les apolipoprotéines ont une fonction structurale importante en participant à la cohésion de l'ensemble. Elles permettent également la reconnaissance des lipoprotéines par différents récepteurs et enzymes, jouant un rôle prépondérant dans l'ensemble de leur métabolisme.

Initialement, les apolipoprotéines ont été subdivisées en trois sous-familles distinctes selon la nomenclature A, B et C (Gustafson et al., 1966), les apoA étant principalement associées aux HDL, les apoB aux LDL et les apoC aux VLDL et HDL. En fait, bien qu'encore couramment utilisée de nos jours, cette nomenclature a considérablement évolué au cours des trente dernières années, en raison de la découverte de nouvelles apolipoprotéines et de profils de distribution spécifiques au sein des lipoprotéines plasmatiques. Le tableau 5 regroupe les caractéristiques principales des apolipoprotéines humaines.

I.1.b.i ApoB100 et apoB48

L'apolipoprotéine majeure des VLDL et des LDL est l'apoB100. Elle est synthétisée par le foie et entre dans le plasma comme constituant des VLDL. L'apoB100 humaine est une protéine de 4536 acides aminés et d'un poids moléculaire apparent de 550 000 Da (Segrest et al., 2001). Chez l'homme sain, la concentration plasmatique en apoB100 est d'environ 80 mg/dL alors que chez le chien elle est d'environ 55 mg/dL. Il y a une seule molécule d'apoB100 par molécule de VLDL et LDL, ce qui permet d'évaluer leur quantité plasmatique (Ganda, 2009). La structure de l'apoB100 est divisée en 5 parties : un domaine globulaire n-terminal, deux domaines hydrophobes en feuillets β et deux domaines hydrophobes en hélices α , un entre les deux feuillets β et l'autre à l'extrémité c-terminale de la protéine (Segrest et al., 2001). Le domaine n-terminal est d'une haute importance pour le métabolisme des VLDL. En effet, ce domaine interagit avec la

Tableau 5 : Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.

Nom	Tissu	Distribution	Fonction
apoAI	Foie, intestin	CM, HDL	Structure, activateur de la LCAT, efflux de cholestérol
apoAII	Foie, (intestin)	HDL	Structure, activateur/inhibiteur de la HL, efflux de cholestérol
apoAIV	Foie, intestin	CM, HDL	TIC, activateur de la LCAT, métabolisme des lipoprotéines riches en TG
apoAV	Foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en TG
apoB100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structure, synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du LDL-R
apoB48	intestin	CM	Structure, synthèse et sécrétion des CM, ligand de récepteur
apoCI	Foie, (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur de la CETP, activateur de la LCAT, inhibiteur de la liaison au récepteur
apoCII	Foie, (intestin)	CM, VLDL, HDL	Activateur de la LPL
apoCIII	Foie, (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur de la LPL, inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
apoD	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau	HDL, LDL, VLDL	TIC ?
apoE	Foie, macrophage, cerveau	CM, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDL-R et LRP
apoF	Foie	LDL, (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
apoG	?	HDL	?
apoH	?	HDL	?
apoJ	?	HDL	Anti-inflammatoire
apoM	Foie, rein	HDL	Efflux de cholestérol, TIC

CETP : *cholesteryl ester transfer protein*, CM : chylomicrons, HDL : *high density lipoprotein*, HL : lipase hépatique, LCAT : *lecithin : cholesterol acyltransferase*, LDL : *low density lipoprotein*, LDL-R : *LDL receptor*, LPL : *lipoprotein lipase*, TIC : transport inverse du cholestérol, TG : triglycéride, VLDL : *very low density lipoprotein*.

Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP), protéine qui permet l'association entre les lipides et l'apoB100 lors de la synthèse des CM et VLDL (Dashti et al., 2002). L'apoB100 est également le ligand du *LDL receptor* et permet donc la capture du cholestérol des LDL par les cellules périphériques.

L'apoB48 est quand à elle synthétisée par l'intestin grêle et entre dans la composition des chylomicrons. Le même gène code l'apoB100 et l'apoB48. Une modification post-transcriptionnelle de l'ARN de l'apoB100 permet l'apparition au niveau d'un site spécifique d'un codon stop UAA à la place d'un codon CAA conduisant à une protéine de 2152 acides aminés, soit 48% de l'apoB100 (Chen et al., 1987, Powell et al., 1987).

I.1.b.ii ApoA

L'apolipoprotéine AI (apoAI) est présente dans la majorité des HDL et y constitue environ 70% de la fraction protéique. Il en résulte que la concentration plasmatique en apoAI est parfaitement corrélée avec celle des HDL. On retrouve également une faible proportion d'apoAI dans les chylomicrons. L'apoAI est principalement synthétisée par le foie et l'intestin et va s'associer avec du cholestérol et des phospholipides pour former les pré- β -HDL. Il semblerait que la part de l'intestin dans la synthèse de l'apoAI ne soit que d'environ 10% (Ikewaki et al., 1993). L'expression du gène de l'apoAI est régulée par une myriade de facteurs nutritionnels, hormonaux ou pharmacologiques : lipides, alcool, estrogènes et androgènes, glucocorticoïdes, fibrates, statines, etc. (Malik, 2003).

Du fait de son importance dans l'initiation du transport inverse du cholestérol en favorisant l'efflux de cholestérol, la concentration en apoAI est un facteur important dans la susceptibilité de développer des maladies cardiovasculaires. Des souris transgéniques possédant le gène de l'apoAI humain ont des niveaux de HDL et d'apoAI très élevés et développent moins de lésions athérosclérotiques (Rubin et al., 1991). L'apoAI est également un activateur de la LCAT, enzyme responsable de l'esterification du cholestérol plasmatique (Frank and Marcel, 2000) et un ligand de SR-BI, récepteur responsable de la capture sélective des esters de cholestérol par le foie (Lagrost et al., 1995).

L'apoAII est la seconde apolipoprotéine des HDL en termes d'abondance (25% de la masse protéique) et est retrouvée dans environ 2/3 des particules de HDL. Elle est synthétisée essentiellement par le foie. Son rôle physiologique est mal connu. Elle inhibe la lipase hépatique,

empêchant ainsi l'hydrolyse des TG et des PL composant les HDL, ce qui modifie leur métabolisme (Zhong et al., 1994). Elle régule la LCAT (Chen and Albers, 1986) et inhibe l'efflux de cholestérol (Hedrick and Lusis, 1994). On a également montré que malgré une augmentation du cholestérol des HDL (HDL-cholestérol), l'apoAII favorise le développement de l'athérosclérose (Schultz et al., 1993, Warden et al., 1993). Chez le chien, l'existence de l'apoAII est très controversée. En effet, Malhey et al. (1976) l'auraient identifié mais Chung et al. (1982) ont au contraire montré son absence.

I.1.b.iii Autres apolipoprotéines

Les apolipoprotéines C forment, chez l'homme comme chez le chien, un groupe de 3 peptides (CI, CII et CIII) de poids moléculaire compris entre 6500 et 8800 Da. Elles sont synthétisées par le foie et l'intestin et sont trouvées dans les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Les apoC ont la propriété de pouvoir être redistribuées entre les différentes classes de lipoprotéines. A jeun, elles sont surtout associées aux HDL. Lors de la sécrétion intestinale des chylomicrons ou durant la synthèse des VLDL par le foie, les apoC sont redistribuées vers ces lipoprotéines riches en triglycérides. Lors du catabolisme de ces lipoprotéines (c'est-à-dire lors de l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase), l'excès d'apoC est libéré et transféré aux HDL.

L'apoCI est l'apoC la moins étudiée. Elle est capable d'activer la LCAT (Soutar et al., 1975). Elle inhibe également la liaison des lipoprotéines aux récepteurs ainsi que la CETP (Gautier et al., 2000). En effet, l'immunodépletion de l'apoCI conduit à une hausse de 43% des échanges via la CETP.

L'apoCII est un cofacteur indispensable de la lipoprotéine lipase (LPL) (Catapano, 1982), et est donc directement liée à la triglycéridémie. Elle peut également inhiber, chez l'homme, à un moindre degré que l'apoCIII, la capture des lipoprotéines riches en TG par les récepteurs hépatiques (Havel, 1986). L'apoCIII est l'apoC la plus athérogène. En effet, on a mis en évidence une forte corrélation entre les concentrations d'apoCIII et de TG (Lee et al., 2003), mais également avec la progression de l'athérosclérose (Hodis, 1999, Alaupovic et al., 1997).

L'apoCIII est le principal inhibiteur endogène de la lipolyse des VLDL. En effet, elle inhibe la LPL (Brown and Baginsky, 1972) et diminue la capture hépatique des particules issues des chylomicrons et des VLDL appelées remnants, aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Quarfordt et

al., 1982, Windler and Havel, 1985), en inhibant la liaison des lipoprotéines à apoB au *LDL receptor* (Clavey et al., 1995). La régulation du métabolisme de l'apoCIII pourrait donc être une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de la dyslipidémie et l'athérosclérose chez les patients atteints de syndrome métabolique (Ooi et al., 2008).

L'ApoE est synthétisée principalement par le foie bien que de nombreux autres tissus puissent également le faire (cerveau, rate, ovaires, etc.). Il existe également une synthèse importante d'apoE par les macrophages (Werb et al., 1986). Cette apolipoprotéine constitue entre 10 et 20% de la partie protéique des VLDL mais on la trouve aussi dans les chylomicrons et les HDL. Son principal rôle est d'assurer la reconnaissance des lipoprotéines par le récepteur à l'apo B/E (*LDL receptor*), le récepteur à l'apoE (*LDL receptor related protein*) et le récepteur des VLDL. De plus, l'apoE, que l'on trouve dans les HDL riches en triglycérides, semble jouer un rôle dans l'efflux de cholestérol vers ces HDL (Mahley et al., 2006).

I.2 Absorption intestinale du cholestérol et voie exogène

Le cholestérol entrant dans la lumière intestinale peut provenir des aliments, de la bile ou bien de la desquamation de l'épithélium intestinal. Chez l'homme, cela représente par jour environ 300-500 mg, 800-1200 mg et 300 mg de cholestérol respectivement. Bien que l'intestin ait la capacité d'absorber du cholestérol sur toute sa longueur, le duodénum et le jéjunum proximal représentent les principaux sites d'absorption (Wang and Carey, 2003). Préalablement à l'absorption par l'entérocyte, des micelles comprenant principalement des acides biliaires, des triglycérides et du cholestérol doivent être formées afin d'assurer le transport des lipides jusqu'à la membrane apicale des cellules où les micelles se désagrègeront pour permettre l'entrée du cholestérol dans l'entérocyte. Bien que la diffusion passive du cholestérol, suivant un gradient de concentration, ait été évoquée (Stange and Dietschy, 1985), son efflux rapide du pôle apical vers la membrane baso-latérale de l'entérocyte et l'inhibition de son absorption par des inhibiteurs spécifiques tel que l'ézétimibe suggèrent que ce processus est régulé par de nombreux gènes et transporteurs (Lammert and Wang, 2005). Parmi ceux-ci, on peut citer le SR-BI

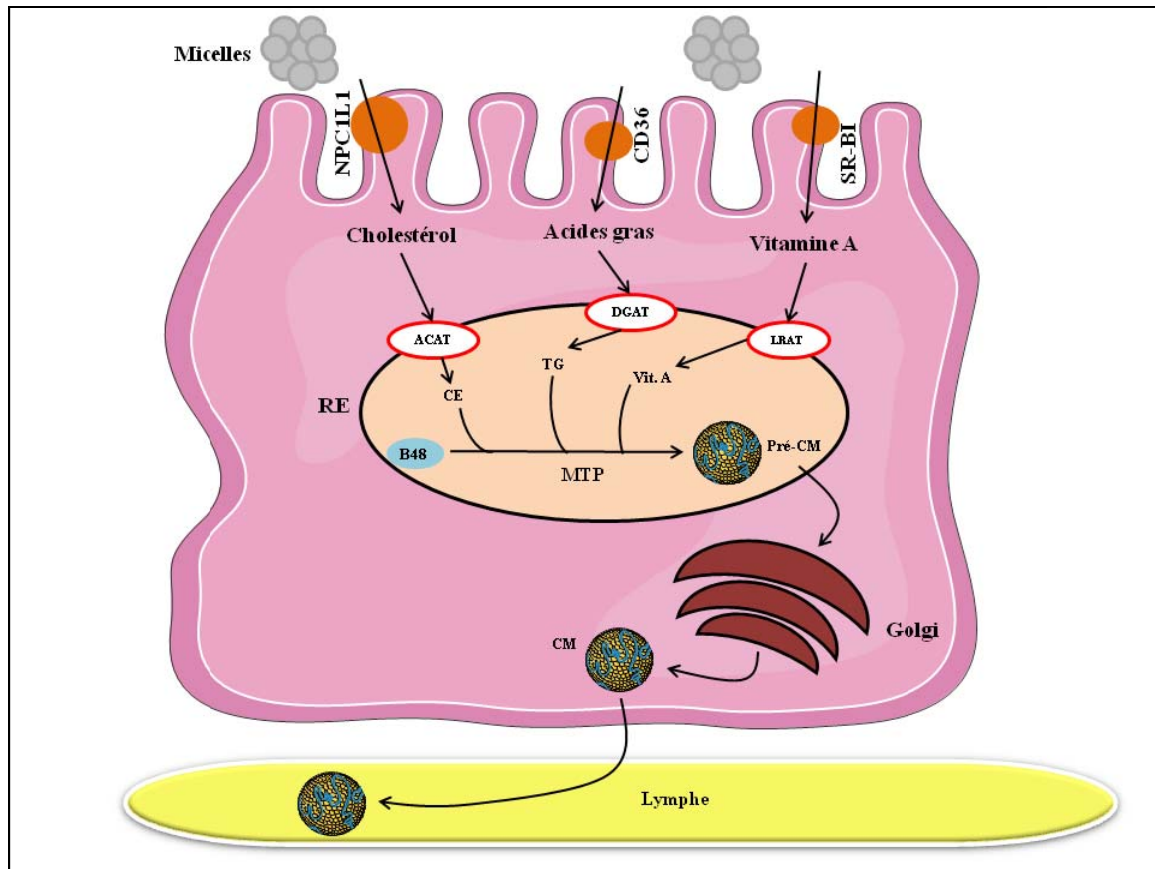


Figure 3 : Absorption intestinale des lipides et synthèse des chylomicrons (Iqbal and Hussain, 2009).

Le cholestérol entre dans l'entérocyte via le transporteur NPC1L1, puis est estérifié par l'action de l'ACAT. Les acides gras entrent dans la cellule grâce au transporteur CD36 et permettent la synthèse de TG grâce à l'action de la DGAT. Le MTP permet ensuite l'assemblage de l'apoB48, du CE, des TG et de la vitamine A pour former les pré-CM, qui après maturation dans l'appareil de golgi, forment les CM. Ceux-ci sont ensuite sécrétés dans la lymphe.

ACAT : *acyl-CoA cholesterol acyltransferase*, AG : acide gras, B48 : apolipoprotéine B48, CE : cholestérol estérifié, CM : chylomicrons, DGAT : *diacylglycerol acyltransferase*, LRAT : *lecithin retinol acyltransferase*, MTP : *microsomal triglyceride transfer protein*, NPC1L1 : *Niemann-Pick C1 like 1*, RE : réticulum endoplasmique, TG : triglycérides, Vit A : vitamine A.

(Iqbal and Hussain, 2009), mais c'est la protéine *Niemann-Pick C1 like 1* (NPC1L1), identifiée en 2004, qui a été caractérisée comme étant le principal transporteur intestinal du cholestérol (Altmann et al., 2004) (figure 3).

L'entérocyte assemble ensuite les EC, les TG, et les apolipoprotéines (principalement l'apoB48) grâce à la MTP et forme les chylomicrons qui vont permettre le transport du cholestérol alimentaire dans la circulation, voie de transport appelée voie exogène du cholestérol (figures 3 et 4). Les chylomicrons sécrétés dans la circulation sont rapidement hydrolysés par la LPL, libérant des acides gras libres, des PL et des apolipoprotéines (apoAI et apoC). Ces dernières vont alors être principalement capturées par les HDL. Ce mécanisme aboutit à la formation de lipoprotéines résiduelles, riches en EC, appelées chylomicrons remnants, qui vont revenir au foie par un mécanisme d'endocytose après reconnaissance de l'apoE par le *LDL receptor* ou le *LDL receptor-related protein* (LRP) (Martins and Redgrave, 2004).

I.3 Voie endogène

Le transport du cholestérol et des TG synthétisés par le foie vers les tissus périphériques (voie endogène) se fait par l'intermédiaire des VLDL (figure 4), assemblage de cholestérol, de TG, de PL et d'apolipoprotéines (B100, CI, CII, CIII et E). Leur concentration augmente fortement après un repas pour revenir à un niveau basal entre les repas. L'apoCII contenue dans les VLDL permet l'activation de la LPL qui hydrolyse les TG, transformant les VLDL en IDL. Une nouvelle hydrolyse conjointe par la LPL et la lipase hépatique transforme les IDL en LDL. L'apoB100 des LDL est ensuite reconnue par le *LDL receptor* qui internalise la lipoprotéine, rendant le cholestérol disponible pour les besoins cellulaires. Lorsque le nombre de *LDL receptor* est insuffisant, que ces récepteurs possèdent une moindre affinité pour les LDL ou encore que l'apport alimentaire de lipides est trop élevé, la concentration plasmatique de cholestérol est anormalement élevée et ce cholestérol se retrouve principalement dans les LDL. Il y a alors une internalisation de LDL dans les macrophages qui se trouvent dans l'intima des vaisseaux, entraînant une transformation de ceux-ci en cellules spumeuses, facteur important de l'athérogenèse.

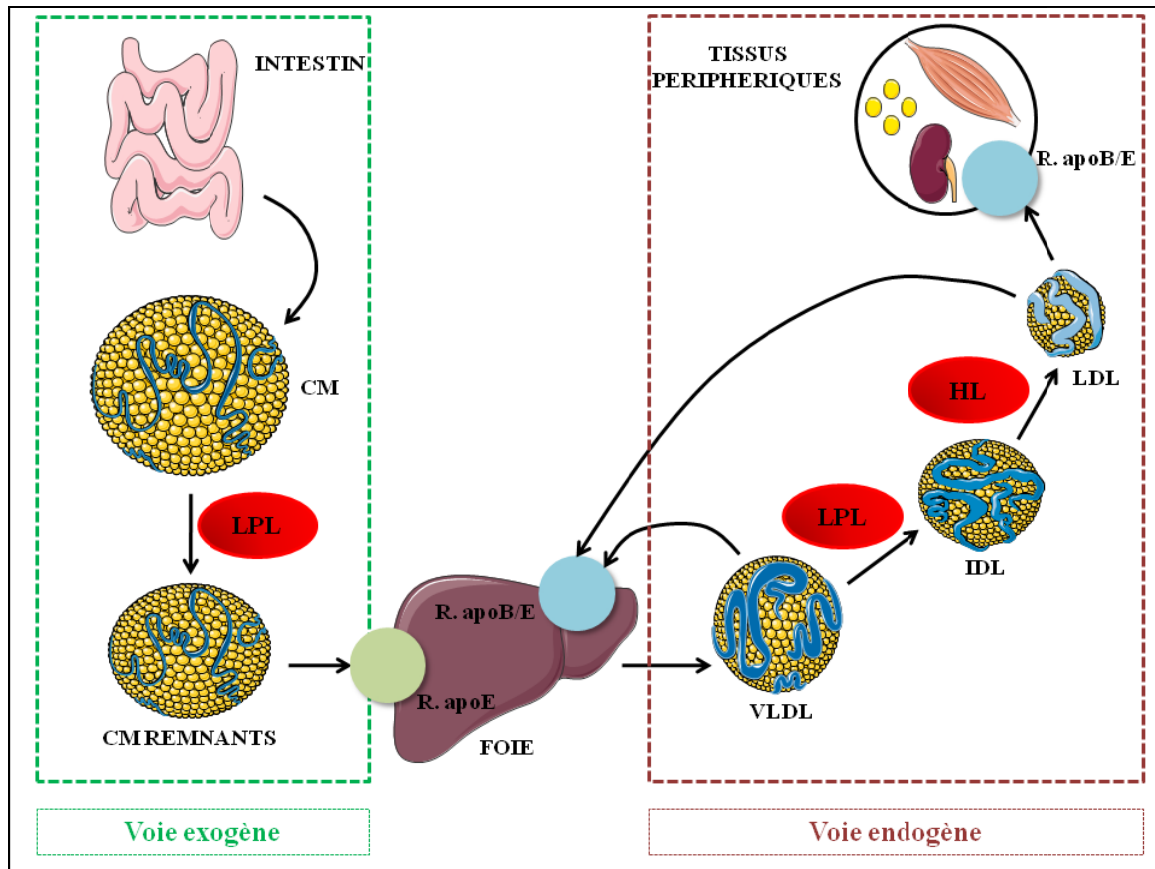


Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines chez l'homme, voie exogène et endogène.

La voie exogène correspond au transport des lipides alimentaires de l'intestin vers le foie. Les entérocytes synthétisent les CM qui sont hydrolysés par la LPL pour former les CM remnants. Ces derniers sont ensuite capturés par le foie, principalement via le récepteur à apoE.

La voie endogène correspond au transport des lipides du foie vers les tissus périphériques. Les VLDL sont synthétisés par le foie, puis hydrolysés par la LPL pour former les IDL. Ceux-ci subissent également une hydrolyse par la HL et conduisent aux LDL. Les LDL sont ensuite captés par les tissus périphériques grâce au *LDL receptor*. Les VLDL et LDL peuvent également être capturés par le foie via ce même récepteur.

CM : chylomicrons, HL : lipase hépatique, LDL : *low density lipoprotein*, IDL : *intermediate density lipoprotein*, LPL : *lipoprotein lipase*, R. apoB/E : récepteur à apoB et E (ou *LDL receptor*), R. apoE : récepteur à apoE, VLDL : *very low density lipoprotein*.

I.4 Transport inverse du cholestérol (TIC)

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre, d'une part, les concentrations plasmatiques d'HDL-C et de l'apoprotéine majeure des HDL, l'apoAI, et, d'autre part, le développement de l'athérosclérose (Boden, 2000). En effet, l'injection d'HDL-C ou d'apoAI prévient l'athérosclérose (Badimon et al., 1990, Duverger et al., 1996). Des résultats identiques ont été mis en évidence chez la souris surexprimant le gène de l'apoAI (Dimayuga et al., 1999). La capacité des HDL à réduire l'athérosclérose, et donc à réduire les MCV, est principalement due à leur rôle prédominant dans le transport inverse du cholestérol (TIC), unique voie de retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie en vue de son élimination de l'organisme sous forme de sels biliaires (figure 5). Décrit pour la 1^{ère} fois il ya plus de 40 ans (Glomset, 1968), le TIC a depuis lors été la cible de nombreux essais thérapeutiques visant, avec plus ou moins de succès, à favoriser le turn-over des HDL dans le but de réduire la progression ou l'apparition de MCV. Nous allons en décrire une à une les différentes étapes, de la sortie du cholestérol des tissus périphériques à son retour au foie.

I.4.a Formation des pré- β -HDL

Les HDL naissantes (pré- β -HDL) ont une structure discoïdale composée d'une couche unique repliée sur elle-même de molécules de PL, d'apolipoprotéines et de cholestérol. L'origine des ces pré- β -HDL est mixte, tissulaire et plasmatique. D'une part, le foie et la muqueuse intestinale sécrètent des HDL discoïdales dont l'apoE est la principale apolipoprotéine. D'autre part, dans la circulation, les replis formés à partir des éléments de surface des chylomicrons et des VLDL, lors de l'hydrolyse des TG, représentent une source importante d'HDL discoïdales contenant principalement de l'apoAI et des apoC. Les pré- β -HDL s'enrichissent alors en apolipoprotéines, en cholestérol et en PL grâce à l'action de différents transporteurs.

I.4.a.i L'ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)

L'ABCA1 a été récemment caractérisé sur le chromosome 9 du génome humain (Santamarina-Fojo et al., 2000). Cette glycoprotéine de la famille des transporteurs ABC possède 2 domaines transmembranaires et 2 domaines intracellulaires de liaison aux nucléotides (Bungert et al., 2001). Son expression a lieu principalement dans les macrophages, le foie, le placenta, l'intestin grêle et les poumons (Kielar et al., 2001). Des mutations du gène de l'ABCA1 ont été

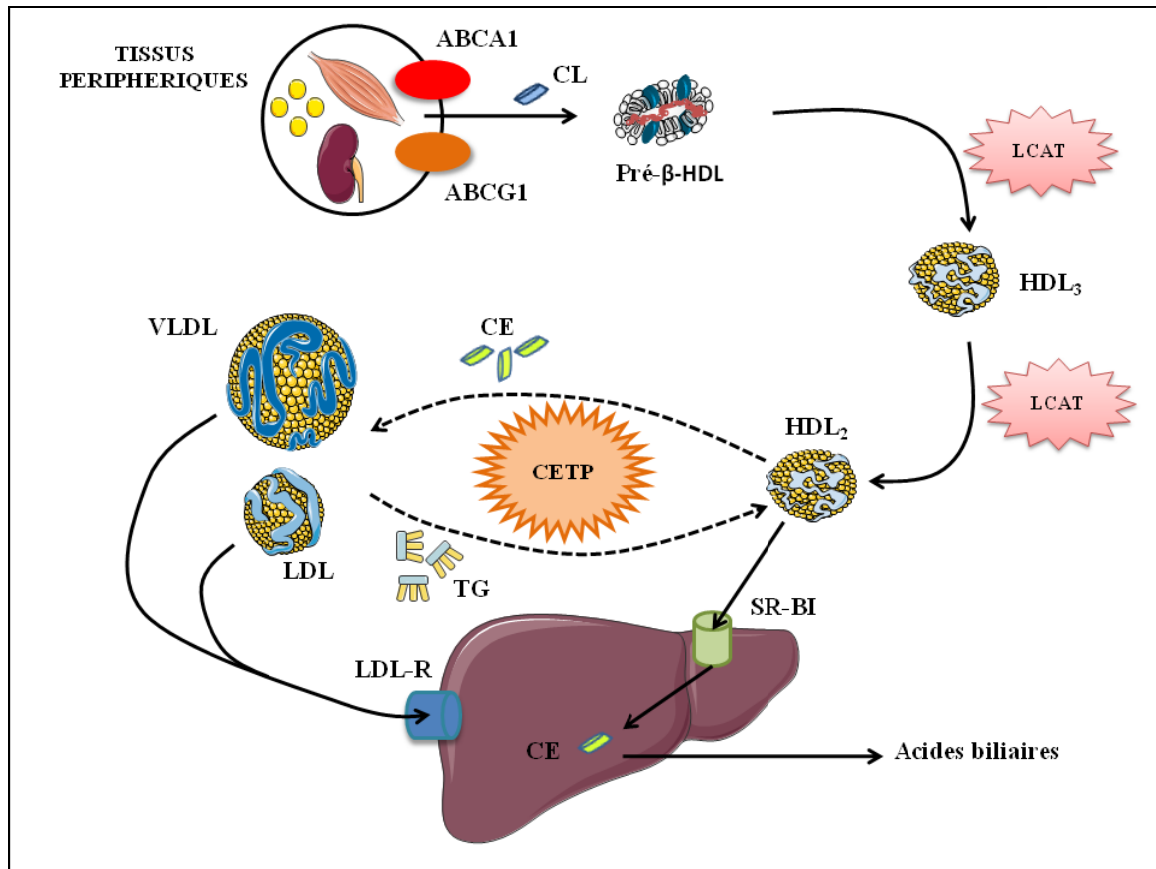


Figure 5 : Représentation schématique du transport inverse du cholestérol chez l'homme.

Le transport inverse du cholestérol débute par l'efflux de CL des tissus périphériques vers l'apoA1 pour former les pré-β-HDL. Ce CL est ensuite estérifié par la LCAT pour former les HDL₃ puis les HDL₂. Le CE des HDL peut être capturé par le foie, principalement via le SR-BI, ou être transférés aux VLDL et LDL grâce à la CETP avant son retour au foie après reconnaissance des VLDL et LDL par le *LDL receptor*. Le CE est ensuite transformé au niveau du foie en acides biliaires pour être excrété dans la bile.

ABCA1 : *ATP binding cassette A1*, ABCG1 : *ATP binding cassette G1*, CE : cholestérol estérifié, CL : cholestérol libre, LCAT : *lecithin cholesterol acyltransferase*, LDL-R : *LDL receptor*, SR-BI : *scavenger receptor class B type I*, TG : triglycérides.

décrites chez l'homme comme conduisant à la maladie de Tangier (Bodzioch et al., 1999), rare maladie génétique caractérisée par une très faible concentration plasmatique en HDL et une accumulation intracellulaire de cholestérol (Francis et al., 1995). Ces symptômes ont également été retrouvés chez des souris KO pour le gène de l'ABCA1 (McNeish et al., 2000). A l'inverse une surexpression de l'ABCA1 entraîne une forte augmentation des niveaux plasmatiques d'HDL (Singaraja et al., 2002, Vaisman et al., 2001).

L'ABCA1 nécessite l'utilisation d'ATP pour le transport transmembranaire de cholestérol et de PL, principalement vers l'apoAI et de façon mineure vers les pré- β -HDL (Oram and Vaughan, 2000, Remaley et al., 2001). En réalité, l'apoAI doit être délipidée ou associée à très peu de lipides pour pouvoir jouer le rôle d'accepteur (Duong et al., 2008, Mulya et al., 2007). Cependant, diverses apolipoprotéines (apoAII, AIV, CI, CII, CIII et E) peuvent également remplir ce rôle d'accepteur mais à un niveau moindre (Remaley et al., 2001). Le mécanisme réel de cet efflux n'est pas encore totalement élucidé. La liaison directe de l'apoAI à l'ABCA1 semble être nécessaire à sa réalisation. En effet, la surexpression de l'ABCA1 entraîne une augmentation de la liaison de l'apoAI à la membrane (Chambenoit et al., 2001) alors que le glyburide, molécule antidiabétique, inhibe cette liaison et, parallèlement, inhibe l'efflux de cholestérol (Wang et al., 2001a). De plus, l'étude des mutations d'ABCA1 a montré que tous les mutants ne pouvant réaliser l'efflux sont également incapables de réaliser de liaison à l'apoAI (Fitzgerald et al., 2002). La lipidation de l'apoAI se ferait alors en 2 étapes. Premièrement, l'apoAI se lierait à l'ABCA1, et dans un deuxième temps, elle s'associerait à du cholestérol et des phospholipides avant d'être relarguée dans le milieu extracellulaire (Chroni et al., 2004, Vedhachalam et al., 2004).

Le principal activateur de l'ABCA1 est le cholestérol (Langmann et al., 1999). La régulation de l'ABCA1 semble être contrôlée par deux récepteurs nucléaires : le LXR (*Liver X Receptor*) et le RXR (*Retinoid X Receptor*) (Costet et al., 2000). L'activation du PPAR γ stimule également l'expression de l'ABCA1 via l'induction du LXR (Schmitz and Langmann, 2005). Le PPAR α active également l'ABCA1 par un mécanisme similaire (Ogata et al., 2009). De plus, il existe également une régulation post-traductionnelle de l'ABCA1, affectant la stabilité de la protéine ou son activité (Oram and Heinecke, 2005).

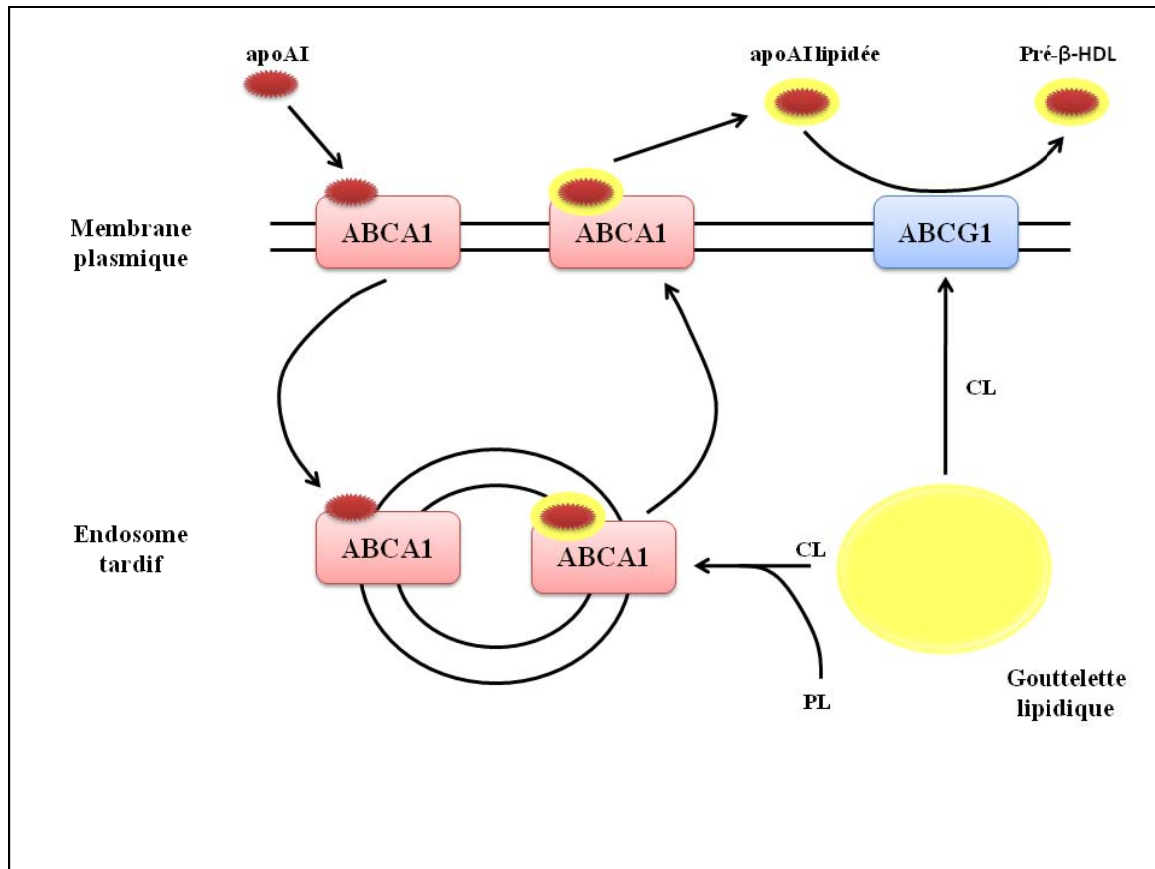


Figure 6 : Efflux de cholestérol suivant le modèle de l'endocytose conjointe de l'apoAI et de l'ABCA1 (Cavelier et al., 2006).

L'apoAI se fixe sur l'ABCA1. Ce complexe est ensuite internalisé, se charge en CL et PL, puis réintègre la membrane. L'apoAI lipidée est ensuite relarguée pour se charger à nouveau en CL grâce à l'ABCG1 et former les pré-β-HDL.

ABCA1 : *ATP binding cassette A1*, ABCG1 : *ATP binding cassette G1*, apoAI: apolipoprotéine AI, CL : cholestérol libre, PL : phospholipides.

1.4.a.ii L'ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)

Contrairement à l'ABCA1, l'ABCG1 comporte un seul domaine de liaison aux nucléotides et un seul domaine transmembranaire de 6 hélices α (Hinrichs et al., 2005). Les transporteurs ABC de ce type sont appelés « demi-transporteurs » et fonctionnent en tant qu'homodimères ou bien qu'hétérodimères en association avec un autre « demi-transporteur » tel que l'ABCG5 ou l'ABCG8 (Graf et al., 2002)(Graf et al., 2002)(Graf et al., 2002)(Graf et al., 2002). L'activité de l'ABCG1 a été mise en évidence qu'en 2000 lorsqu'on a montré que la suppression antisens de l'ABCG1 dans des macrophages humains conduisait à une réduction de l'efflux de cholestérol vers les HDL₃ (Klucken et al., 2000). Ceci a par la suite été validé grâce à l'utilisation de siRNA dirigés contre l'ABCG1 chez la souris (Wang et al., 2004). En effet, la perte de fonction de l'ABCG1 entraîne une forte diminution des concentrations plasmatiques de HDL-C (Wiersma et al., 2009). A l'inverse, la surexpression de l'ABCG1 chez la souris (Nakamura et al., 2004, Wang et al., 2004) et chez l'homme (Gelissen et al., 2006, Vaughan and Oram, 2005) entraîne une stimulation du transfert de cholestérol vers les HDL. L'ABCG1 est exprimé dans la plupart des tissus mais les lieux principaux de son expression sont les macrophages, les cellules endothéliales et les lymphocytes (Kennedy et al., 2005).

Contrairement à l'ABCA1 qui a pour récepteur principal l'apoAI, l'ABCG1 est incapable de transférer du cholestérol vers les apolipoprotéines délipidées. L'ABCG1 requiert un accepteur contenant des PL tels que des HDL, des ensembles apoAI-PL ou encore des vésicules unilamellaires de PL (Gelissen et al., 2006). De plus, l'ABCG1 semble ne pas pouvoir exporter de PL (Kennedy et al., 2005). En réalité, l'ABCA1 et l'ABCG1 semblent fonctionner de manière séquentielle (Gelissen et al., 2006, Vaughan and Oram, 2006). Le transfert de lipides vers l'apoAI par l'ABCA1 semble être suffisant pour générer un accepteur efficace rendant possible un efflux de cholestérol par ABCG1 (Gelissen et al., 2006) (figure 6).

Le contrôle de l'expression de l'ABCG1 possède des similarités avec celui de l'ABCA1, ce qui est en accord avec un rôle partagé dans l'efflux de cholestérol. Dans des macrophages humains, l'expression de l'ABCG1 est induite par le cholestérol et par les ligands du LXR tel que les oxystérols (Venkateswaran et al., 2000) ou des agonistes pharmacologiques (Wiersma et al., 2009). En effet, le promoteur de l'ABCG1 possède des sites de liaison au LXR et au RXR

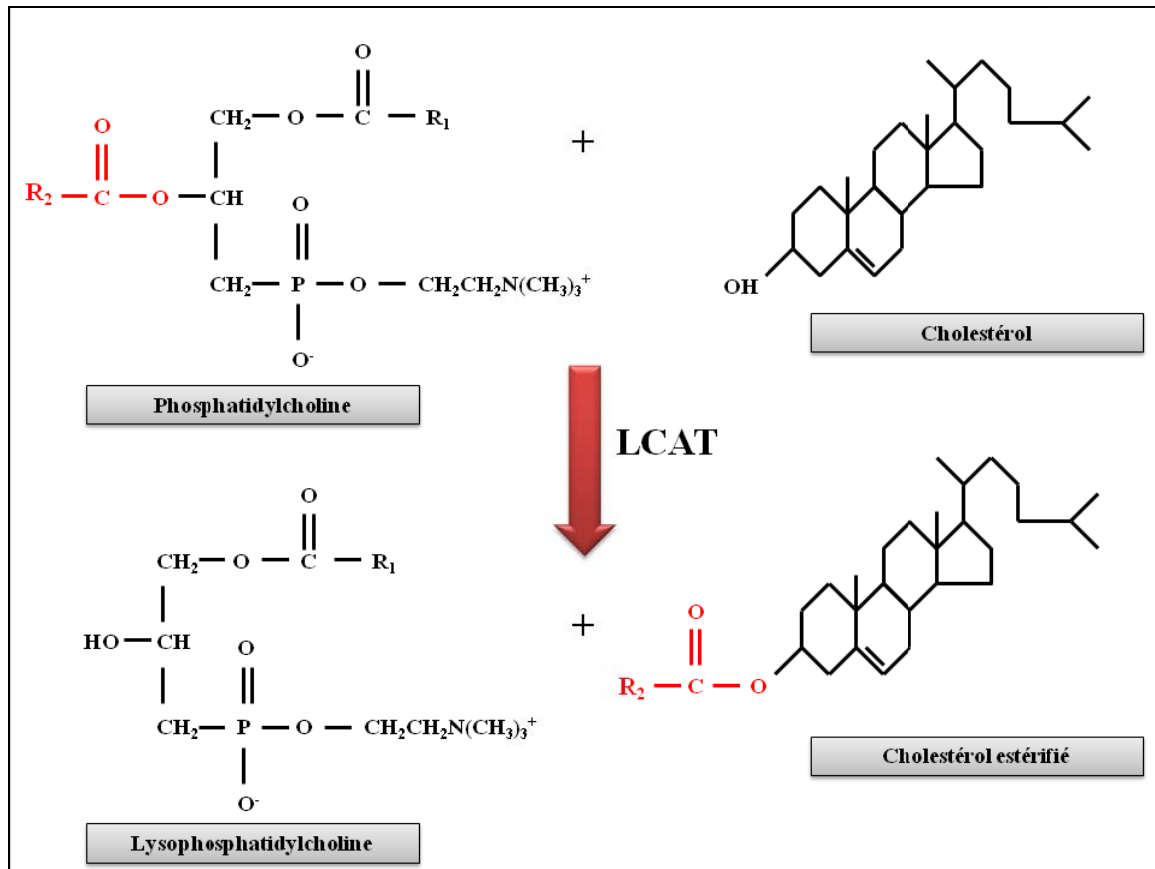


Figure 7 : Représentation schématique de la réaction d'estérification du cholestérol par la lecithin: *cholesterol acyltransferase* (LCAT).

L'acide gras en position sn-2 d'une phosphatidylcholine est transféré sur la fonction hydroxyle du cholestérol. Cette réaction permet l'obtention du cholestérol estérifié et d'une lysophosphatidylcholine.

(Kennedy et al., 2001, Sabol et al., 2005). Bien que les agonistes du PPAR γ induisent l'expression de l'ABCG1 et de l'ABCA1 (Chawla et al., 2001), on a montré dans des cellules LXR-/- que ces mêmes agonistes induisent uniquement l'ABCG1, soulignant un mécanisme additionnel de contrôle indépendant du LXR (Li et al., 2004).

I.4.a.iii Le scavenger receptor-BI (SR-BI)

Le SR-BI a été initialement caractérisé dans le foie pour sa capacité à réaliser une capture sélective, unidirectionnelle, d'EC, de PL et de TG provenant principalement des HDL sans internalisation des lipoprotéines. Cette fonction sera présentée en détails un peu plus loin. Cependant, on a montré que le SR-BI peut également permettre un échange bidirectionnel de CL entre les cellules et les HDL, la direction de cet échange étant dépendante du gradient de concentration (Connelly and Williams, 2004, Yancey et al., 2003). Comme l'ABCG1, le SR-BI possède un large spectre d'accepteurs contenant des PL tels que les HDL, les LDL et les vésicules unilamellaires de PL (de la Llera-Moya et al., 1999, Ji et al., 1997). Cependant, l'importance réelle de l'efflux de cholestérol par le SR-BI *in vivo* n'a pas été clairement mise en évidence.

I.4.b Formation des α -HDL

La transformation des pré- β -HDL (particules discoïdales) en α -HDL (HDL₂ et HDL₃, particules sphériques) se fait par estérification du cholestérol par la *lecithin:cholesteryl acyl transferase* (LCAT). Cette enzyme, décrite pour la 1^{ère} fois en 1968 (Glomset, 1968), est principalement synthétisée par le foie mais également, à un plus faible niveau, par le cerveau et les testicules (Warden et al., 1989). L'expression de la LCAT est relativement insensible à la plupart des agents pharmacologiques et nutritionnels.

La réaction d'estérification se déroule en deux étapes. Tout d'abord, après liaison avec la lipoprotéine, la LCAT hydrolyse l'acide gras en position sn-2 d'une phosphatidylcholine. Cet acide gras est ensuite transestérifié sur le groupe hydroxyl en position 3 du 1^{er} cycle du cholestérol (figure 7). Comme les EC sont plus hydrophobes que le CL, ils migrent vers le cœur de la lipoprotéine, la rendant plus sphérique. Environ 75% de l'activité LCAT du plasma est associée aux HDL mais l'enzyme est capable d'agir également sur le cholestérol des lipoprotéines à apoB (Rajaram and Barter, 1985, Subbaiah et al., 1980).

L'apoAI est l'un des plus puissants activateurs de la LCAT mais le mécanisme exact de cette activation n'est pas connu (Alexander et al., 2005, Sviridov et al., 2000). L'hypothèse la plus probable est une stabilisation de la LCAT dans sa forme active. Il faut noter que l'apoE est également capable d'activer, de manière moins puissante, la LCAT qui agit alors sur les lipoprotéines à apoB (Zhao et al., 2005).

La LCAT joue un rôle important dans le TIC. En effet, l'estérification du cholestérol des HDL augmente le gradient de concentration de CL entre les cellules et les HDL et favorise l'efflux de cholestérol (Czarnecka and Yokoyama, 1996). De plus, en migrant au sein des HDL, les EC sont moins susceptibles de retourner vers les cellules, ce qui accroît également l'efficacité du TIC (Czarnecka and Yokoyama, 1996). L'activité LCAT semble donc être bénéfique en termes de réduction du risque de MCV. Cependant, une activité LCAT élevée ne prédit pas une faible incidence de MCV (Dullaart et al., 2009) alors qu'inversement, une faible activité LCAT n'est pas non plus associée à un accroissement de l'athérosclérose (Holleboom et al., 2009).

I.4.c Remodelage des HDL

Les α -HDL peuvent être capturés directement par des récepteurs au niveau du foie. Cependant, des remodelages via des protéines de transfert (CETP, PLTP) ou des lipases (LPL, HL, EL) ont une grande importance dans le métabolisme du cholestérol.

I.4.c.i La cholesteryl ester transfer protein (CETP)

La *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) est une glycoprotéine hydrophobe principalement sécrétée par le foie et le tissu adipeux et que l'on retrouve sous forme circulante dans le plasma, principalement liée aux HDL (Tall, 1993). Elle permet le transfert d'EC des HDL vers les lipoprotéines à apoB100 en échange de TG, par un processus qui résulte en une équilibration des lipides entre les différentes fractions lipoprotéiques. Lorsque les niveaux de VLDL sont normaux, les transferts d'EC sont principalement en faveur des LDL (Guerin et al., 2001). A l'inverse, lorsque les concentrations de VLDL sont plus élevées (tel qu'en cas de syndrome métabolique), les échanges d'EC se font vers les VLDL. Ces VLDL, plus grandes et riches en TG, s'enrichissent également en cholestérol, devenant dès lors plus athérogènes (Guerin et al., 2001). De plus, en cas de syndrome métabolique, l'hydrolyse accrue de ces VLDL par la LPL, associée à un enrichissement des LDL en EC, rend ces dernières plus denses et plus petites, augmentant ainsi leur athérogénicité (Verges, 2005).

L'importance de la CETP dans le métabolisme des HDL a été mise en évidence chez des patients japonais déficients pour la CETP qui présentaient des taux de HDL-cholestérol très élevés et un catabolisme réduit de l'apoAI (Hirano et al., 1997, Ikewaki et al., 1995). Depuis lors, des études génétiques ont permis de mieux caractériser le rôle de cette protéine. Premièrement, l'expression de la CETP humaine chez des souris transgéniques entraîne une diminution de la concentration plasmatique en HDL associée à une légère augmentation des concentrations plasmatiques en cholestérol dans les VLDL et les LDL et à une hausse des niveaux d'apoB100 (Agellon et al., 1991, Jiang et al., 1993). Deuxièmement, des études d'inhibition de la CETP ont été réalisées chez des lapins, en raison de leur forte susceptibilité à développer de l'athérosclérose. L'étude la plus marquante a été réalisée à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique réduisant l'activité de la CETP de plus de 90% (Okamoto et al., 2000). Cette inhibition a été accompagnée d'une diminution de moitié du cholestérol des VLDL et LDL, d'un doublement du niveau plasmatique de HDL-cholestérol et d'une réduction de 70% des lésions athérosclérotiques. Récemment, une grande méta-analyse de 46 études sur plus de 27000 patients présentant des lésions coronaires a clairement montré un lien entre CETP et MCV (Thompson et al., 2008).

La CETP a alors été qualifiée de protéine pro-athérogénique et son inhibition a été une voie de traitement possible de la dyslipidémie associée à l'obésité et l'insulinorésistance. Cependant, la 1^{ère} étude clinique sur le torcetrapib, un inhibiteur de la CETP, a été prématurément stoppée pour cause de mortalité accrue suite à un dysfonctionnement endothélial et à l'apparition d'hypertension artérielle (Barter et al., 2007). De nouveaux inhibiteurs ne possédant pas les effets secondaires du torcetrapib sont actuellement en cours de développement (Bloomfield et al., 2009, Joy and Hegele, 2009, Wolk et al., 2009) mais n'ont pour le moment pas été testés à grande échelle chez l'homme.

Le chien a la particularité, tout comme le rat et la souris, de ne pas exprimer la CETP (Bailhache et al., 2004). Cette particularité fait du chien un modèle particulièrement adapté pour l'étude de la voie de retour du cholestérol au foie via les HDL.

1.4.c.ii La phospholipid transfer protein (PLTP)

La *phospholipid transfer protein* (PLTP) transfère des PL de surface des VLDL vers les HDL lors de l'hydrolyse des TG des VLDL par la LPL (Huuskonen et al., 2001). De plus, la

PLTP peut promouvoir le remodelage des HDL par le transfert direct entre HDL, favorisant ainsi la synthèse de HDL₂ aux dépens des HDL₃ (Lagrost, 1997). En effet, outre les PL, la PLTP est capable de transférer de nombreuses molécules amphiphiles tel que du cholestérol, des diacylglycérols ou de la vitamine E.

Chez l'homme, l'expression de la PLTP a été mise en évidence au niveau du placenta, du pancréas et du tissu adipeux (Day et al., 1994). La surexpression de la PLTP chez la souris entraîne une diminution de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol du fait d'une hausse de leur catabolisme (Moerland et al., 2007, Yang et al., 2003) mais induit la formation de pré-β-HDL (van Haperen et al., 2000). A l'inverse, des souris knock-out pour la PLTP ont également des taux diminués de cholestérol, PL et apoAI dans les HDL (Jiang et al., 1999). Ces souris présentent également un catabolisme de l'apoAI et des EC des HDL quatre fois plus élevé que des souris sauvages (Qin et al., 2000).

Les niveaux d'expression de PLTP sont plus élevés chez les patients obèses (Kaser et al., 2001), ainsi que chez les patients atteints de diabète de type II (Borggreve et al., 2003). De plus, des études épidémiologiques ont montré qu'une forte activité de la PLTP est associée à un risque accru de MCV (Schlitt et al., 2003), alors qu'inversement, une déficience en PLTP chez la souris s'accompagne d'une forte diminution de l'athérosclérose (Jiang et al., 2001). Cependant, la PLTP aurait également un impact pro-athérogénique, en augmentant la synthèse des lipoprotéines à apoB100 (Jiang et al., 2001) et en favorisant leur oxydation. Les quelques études épidémiologiques publiées montrent au final des résultats variables quand à l'association entre PLTP et MCV (Tzotzas et al., 2009).

1.4.c.iii La lipoprotein lipase (LPL)

La *lipoprotein lipase* (LPL) est exprimée par de nombreux tissus, mais on la retrouve principalement au niveau du muscle et du tissu adipeux (Merkel et al., 2002). Son activité TG lipase est environ 100 fois plus élevée que son activité PL lipase. Elle est activée par l'apoCII (Catapano, 1982) et inhibée par l'apoCIII (Wang et al., 1985). L'hydrolyse des chylomicrons et VLDL par la LPL entraîne la libération de cholestérol, d'apolipoprotéines et de PL qui sont alors capturés par les HDL. La LPL influence donc le métabolisme des HDL. En effet, on a démontré une corrélation positive entre l'activité de la LPL et les niveaux d'HDL-cholestérol (Tornvall et al., 1995). A l'inverse, des déficiences homozygotes ou hétérozygotes en LPL conduisent chez

l'homme à une forte réduction de la concentration plasmatique en HDL. La création de souris génétiquement modifiées a permis de montrer que l'effet hypotriglycéridémiant de la LPL n'est visible qu'en présence de la CETP (Clee et al., 1997). Il semble donc que celle-ci est indispensable pour répercuter les effets hypotriglycéridémiants de la LPL sur les HDL par une baisse des échanges entre lipoprotéines.

1.4.c.iv La lipase hépatique (HL)

La lipase hépatique (HL) est une enzyme lipolytique synthétisée par le foie qui catalyse aussi bien l'hydrolyse des TG et des PL, et est, par ce biais, impliquée dans la conversion des IDL en LDL ainsi que dans le remodelage des HDL (Perret et al., 2002). L'activité TG lipase est cependant 20 fois plus élevée que l'activité PL lipase. Les substrats principaux de la HL sont les chylomicrons remnants, les IDL ainsi que les HDL de grandes tailles enrichies en TG.

La relation entre HL et MCV n'a pas été clairement définie. On a montré que la HL favorisait une diminution de la taille de LDL (Baynes et al., 1991). De plus, une corrélation inverse entre son activité et la concentration plasmatique en HDL a été mise en évidence ainsi qu'une corrélation positive avec l'insulinorésistance (Baynes et al., 1991). La HL possède donc des effets pro-athérogéniques. Mais d'un autre côté, la HL semble également posséder des effets anti-athérogéniques. En effet, elle permet une stimulation du transport inverse du cholestérol par une hausse de la capture des EC (Lambert et al., 2000, Lambert et al., 1999), potentiellement grâce à l'hydrolyse des TG des HDL. Au final, les effets anti ou pro-athérogéniques de la HL n'ont pour le moment pas été clairement élucidés.

1.4.c.v La lipase endothéliale (EL)

La lipase endothéliale (EL) est une autre lipase, synthétisée par les cellules endothéliales, et possédant une activité lipolytique équivalente sur les TG et les PL. L'EL est plus active sur les PL des HDL que la LPL ou la HL (McCoy et al., 2002). Chez la souris, la surexpression de l'EL diminue les taux de HDL-cholestérol d'environ 20% (Ishida et al., 2003) de même que ceux de l'apoAI du fait d'un catabolisme élevé (Maugeais et al., 2003). Inversement, l'inhibition ou la perte de fonction de l'EL résulte en une augmentation de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol. Bien que l'EL soit une cible potentielle pour les traitements des dyslipidémies, seules

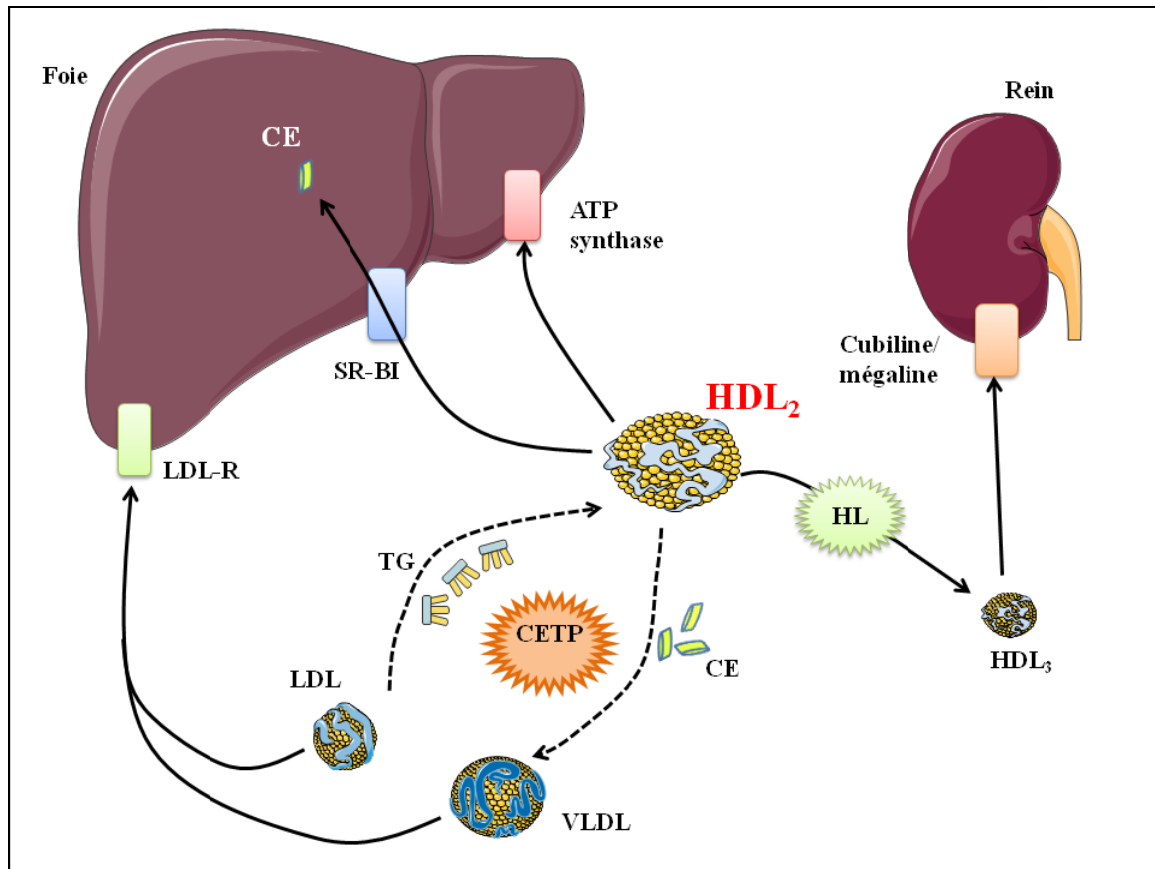


Figure 8 : Catabolisme des HDL.

Le CE des HDL peut être capté par le foie, soit sélectivement via le SR-BI, soit de façon apoA1 dépendante, notamment par reconnaissance des HDL par la chaîne β de l'*ATP synthase*. Il peut être également transféré aux VLDL et LDL grâce à la CETP et être capté par le foie après reconnaissance des VLDL et LDL par le *LDL receptor*. Enfin, les HDL₂ peuvent subir une lipolyse par la HL. Les HDL₃ formés peuvent être filtrés par le rein grâce au complexe cubiline/mégaline.

CE : cholestérol estérifié, CETP : *cholesteryl ester transfer protein*, HL : lipase hépatique, LDL-R : *LDL receptor*, SR-BI : *scavenger receptor class B type I*, TG : triglycérides.

quelques études ont cherché à caractériser son mode d'action (Griffon et al., 2009), sans toutefois apporter de détails déterminants quant à son rôle.

I.4.d Catabolisme des HDL

Le retour des HDL et/ou du cholestérol au foie (et, en faible partie, au rein) en vue de l'élimination du cholestérol de l'organisme peut se faire par trois voies différentes. Tout d'abord, le cholestérol estérifié peut être capturé spécifiquement par le SR-BI, voie appelée capture sélective. Ensuite, ce retour peut se faire après transfert sur les lipoprotéines à apoB via la CETP. Enfin, la troisième voie consiste en une internalisation complète des particules de HDL via différents récepteurs. Récemment, une élimination directe du cholestérol par l'intestin, appelée *transintestinal cholesterol excretion* (TICE) a été mise en évidence sans que son importance physiologique n'ait pour le moment été déterminée. La figure 8 représente de façon schématique les différentes voies de retour du cholestérol au foie.

I.4.d.i Capture sélective

Le *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) appartient à la famille des protéines CD36. Chez l'homme, le gène codant pour le SR-BI se situe sur le chromosome 12 et conduit à une protéine glycosylée de 509 acides aminés (Rigotti et al., 2003). *In vitro*, le SR-BI semble se concentrer au sein des radeaux lipidiques, microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides (Babitt et al., 1997). Cependant, aucune explication concernant cette localisation spécifique n'a pour le moment été avancée. De plus, la localisation du SR-BI au sein de ces radeaux ne semble pas être indispensable à son fonctionnement (Briand et al., 2003).

Le SR-BI a été le premier récepteur aux HDL ayant une réelle importance physiologique à être identifié (Acton et al., 1996). Cependant, il est également capable de lier les LDL (Acton et al., 1994) ainsi qu'à un niveau moindre les VLDL (Calvo et al., 1997). Néanmoins, dans la mesure où l'affinité des HDL pour le SR-BI est plus élevée que celle des LDL, ces dernières ne semblent pas affecter la liaison des HDL *in vivo*.

La régulation de l'expression du SR-BI se fait par l'intermédiaire de différents facteurs de transcription. En effet, le LXR, le FXR et le PPAR α favorisent l'expression du SR-BI (Chinetti et al., 2000, Lambert et al., 2003, Schoonjans et al., 2002). Les acides gras polyinsaturés oméga 3 augmentent également l'expression du SR-BI via ces différents facteurs (Spady et al., 1999).

Le SR-BI réalise la capture du cholestérol, que ce soit sous forme libre ou estérifiée, sans qu'il y ait dégradation des particules de HDL (Acton et al., 1996). Des études *in vivo* sur des hépatocytes polarisés ont suggéré que le SR-BI réaliserait tout d'abord l'internalisation des particules de HDL, le cholestérol étant ensuite libéré dans la cellule avant la resécrétion de petites HDL appauvris en cholestérol (Silver et al., 2001).

De nombreuses études chez les rongeurs ont montré que le SR-BI joue un rôle critique dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Par exemple, la surexpression du SR-BI chez la souris accroît fortement la capture hépatique de cholestérol et réduit la concentration plasmatique de HDL-cholestérol (Kozarsky et al., 1997). Inversement, la délétion du gène du SR-BI chez la souris réduit la capture hépatique de cholestérol et augmente le HDL-cholestérol plasmatique (Brundert et al., 2005, Rigotti et al., 1997). De ce fait, l'expression hépatique du SR-BI apparaît être un important régulateur du transport inverse du cholestérol. La surexpression du SR-BI accroît le transport inverse du cholestérol alors que la déficience en SR-BI le diminue (Zhang et al., 2005), ce qui est en accord avec une diminution de l'athérosclérose observée lors de la surexpression du SR-BI (Arai et al., 1999, Kozarsky et al., 2000, Ueda et al., 2000).

L'importance de la capture sélective dans le retour du cholestérol chez l'homme semble cependant être relativement faible (autour de 10%) (Schwartz et al., 2004) alors qu'elle représente environ 60% chez le chien (Ouguerram et al., 2004).

1.4.d.ii Retour au foie via les lipoprotéines à apoB

Chez l'homme, il existe une autre voie de retour du cholestérol au foie. En effet, via la CETP, les EC peuvent être transférés aux lipoprotéines à apoB, transfert suivi d'une capture hépatique de ces lipoprotéines. La confirmation de l'importance quantitative de cette voie chez l'homme a été démontrée par l'injection de HDL marquées au niveau des EC. En effet, le cholestérol marqué retrouvé dans la bile avait tout d'abord subi un important transfert dans les lipoprotéines à apoB (Schwartz et al., 2004). Chez l'homme, environ 82% du cholestérol subit ce transfert vers les lipoprotéines à apoB100 avant son retour vers le foie (Ouguerram et al., 2002).

1.4.d.iii Endocytose des HDL

La troisième voie de retour du cholestérol au foie (et en faible partie au rein) peut se faire par internalisation des particules HDL entières. Différents mécanismes et récepteurs ont été mis

en évidence mais l'importance et la réalité physiologique de chacun n'ont, pour le moment, pas été clairement élucidées.

La chaîne β de l'*ATP synthase*

L'*ATP synthase* est un complexe enzymatique responsable de la synthèse d'ATP dans les mitochondries, les membranes procaryotes et les chloroplastes. Cette activité bien connue ne sera pas détaillée ici. L'*ATP synthase* est également impliquée dans divers processus cellulaires ou métaboliques tels que la régulation du métabolisme lipidique, le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules endothéliales ou encore la reconnaissance immunitaire de tumeurs (Champagne et al., 2006).

Même si les sous-unités α et β de l'*ATP synthase* ont été observées ensemble sur les membranes plasmiques de cellules tumorales, elles ont été parfois détectées séparément, ouvrant la voie à la démonstration de l'existence de différents complexes les incluant (Scotet et al., 2005). En ce qui concerne le métabolisme des lipoprotéines, la sous-unité β a été récemment décrite comme étant un récepteur de haute affinité pour la forme délipidée de l'apoAI et des HDL lipolysées (Martinez et al., 2003, Radojkovic et al., 2009). Il semble que l'interaction entre l'apoAI et cette sous-unité β entraîne l'internalisation des HDL (Garcia et al., 1996).

Cependant, l'importance réelle de ce mécanisme dans le métabolisme de l'apoAI et des HDL n'a, pour le moment, pas été étudiée. De nouvelles études sont donc nécessaires afin de définir plus précisément le rôle joué *in vivo* par l'*ATP synthase* sur le métabolisme des lipoprotéines.

Le complexe cubiline/mégaline

Au niveau du glomérule rénal, l'apoAI peut se fixer à la cubiline au niveau de la surface apicale des cellules rénales (Hammad et al., 1999). Après interaction avec son corécepteur, la mégaline, il y a capture puis dégradation de l'apoAI (Hammad et al., 2000). Ce système est capable d'internaliser les HDL mais, en conditions physiologiques, la taille et les propriétés physicochimiques des HDL empêchent leur passage à travers les glomérules (Kozyraki, 2001). Le système cubiline/mégaline se semble donc pas jouer un rôle important dans le métabolisme des HDL et ne représente pas un déterminant majeur de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol et leur apoAI.

1.4.d.iv Le transintestinal cholesterol excretion (TICE)

Il est clair que l'intestin joue un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol ainsi que dans l'absorption de celui-ci. Cependant, des études récentes ont révélé que l'intestin agit également comme un organe excréteur au terme du transport inverse du cholestérol, contribuant ainsi à son excrétion fécale. La découverte du TICE a été faite chez des patients atteints d'un carcinome de la tête du pancréas obstruant le canal biliaire. Chez ces patients, du cholestérol a été retrouvé dans les fèces malgré l'absence de déversement de sels biliaires (Cheng and Stanley, 1959). La quantification de cette voie a montré que, suivant les études, jusqu'à 30 à 45% du cholestérol des fèces pouvait provenir du TICE (Plosch et al., 2002, Schwarz et al., 1998, Simmonds et al., 1967). Le TICE peut être observé sur toute la longueur de l'intestin grêle, mais il semblerait que la partie proximale de celui-ci présente un niveau d'excretion de cholestérol plus élevé.

Le mécanisme du TICE n'a pour le moment pas été clairement établi. Il semblerait que les transporteurs ABCG5 et ABCG8 y jouent un rôle important puisque leur surexpression chez la souris entraîne une augmentation significative de stérols neutres dans les fèces (Yu et al., 2002) alors que la répression de l'ABCG5 provoque une réduction de leur excretion (Van Der Veen et al., 2009). De plus, l'activation du LXR augmente la sécrétion intestinale de cholestérol uniquement en présence de l'ABCG5 et de l'ABCG8 (Yu et al., 2003).

Le TICE est deux fois plus important chez des souris nourries avec un régime gras (Van Der Velde et al. 2008). Cette augmentation n'est pas retrouvée lorsque les souris sont nourries avec un régime enrichi uniquement en cholestérol, ce qui suggère que le niveau du TICE puisse être principalement contrôlé par l'apport lipidique du régime.

Une des questions à laquelle les études à venir doivent s'efforcer de répondre est l'origine du cholestérol excrété. En effet, on a montré que, chez des souris knock-out pour l'Abcb4, une protéine de la membrane de l'entérocyte impliquée dans la sécrétion de phospholipides, une partie du cholestérol excrété par le TICE provenait directement du plasma (Kruit et al., 2005). Plus récemment, ces résultats ont été également observé chez des souris normales (Van der Velde et al., 2009). En utilisant une méthode de quantification de la contribution des différentes sources de cholestérol au sein du TICE par l'utilisation d'isotopes stables du cholestérol administrés oralement ou par intraveineuse, ces auteurs ont clairement confirmé chez la souris que le cholestérol excrété provenait du plasma plutôt que de l'intestin (Van Der Veen et al., 2009). Il

reste cependant à définir de quelle fraction lipoprotéique peut provenir ce cholestérol. Le rôle des HDL en tant que donneur de cholestérol est discutable. En effet, des souris knock-out pour l'ABCA1, possédant des concentrations plasmatiques de HDL-cholestérol très bas, ne présentent pas de diminution de l'excretion de cholestérol (Groen et al., 2001).

Tableau 6 : Classification de l'état corporel en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) chez l'homme.

Valeur de l'IMC	Etat corporel
< 16,5	Dénutrition
16,5 à 18,5	Maigreur
18,5 à 25	Corpulence normale
25 à 30	Surpoids
30 à 35	Obésité modérée
35 à 40	Obésité sévère
> 40	Obésité morbide

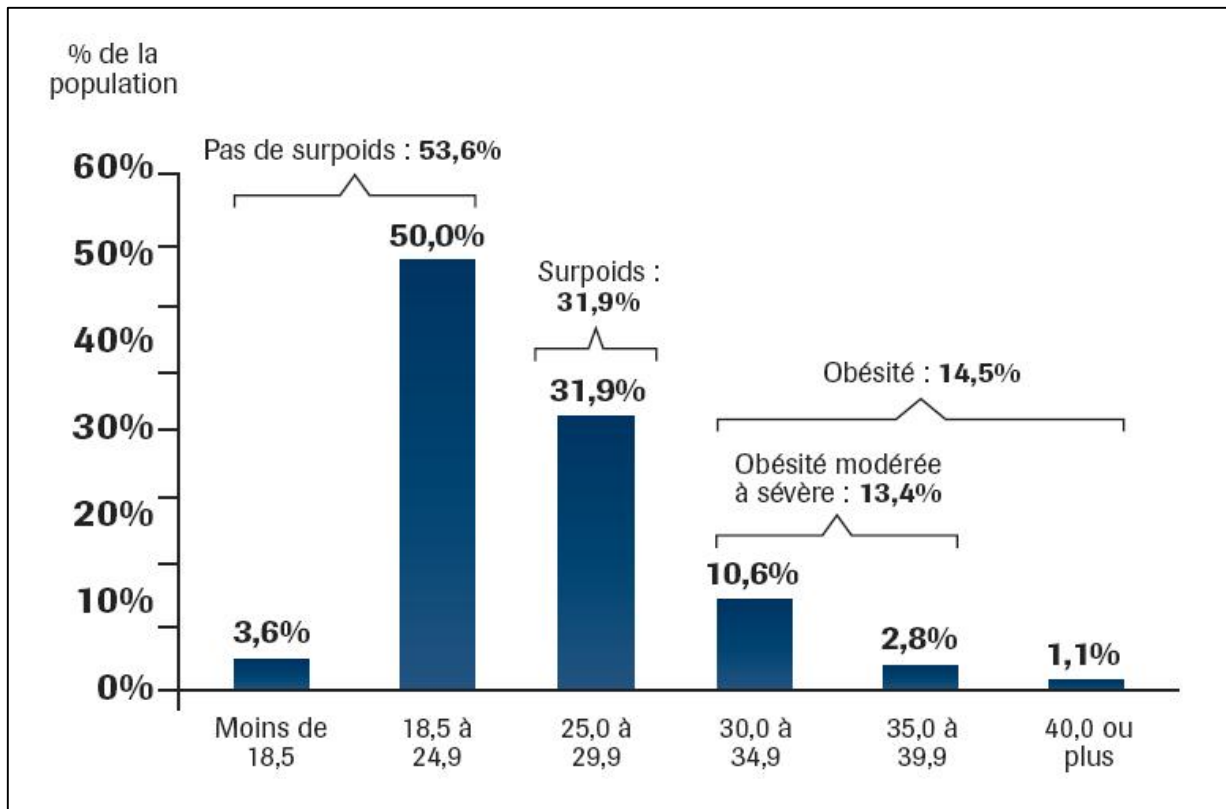


Figure 9 : Répartition de la population française en fonction de l'IMC (étude Obépi 2009).

II. Perturbations métaboliques et cellulaires associées à l'obésité

II.1 Le syndrome métabolique : définition et incidence

II.1.a L'obésité

Dans notre société occidentale, le progrès s'accompagne d'une réduction du travail physique, d'une sédentarisation de plus en plus marquée et d'un accès presque illimité aux calories, du moins pour une proportion croissante de la population. Du fait d'un déséquilibre dans la balance apports/dépenses, le surplus de calories est stocké sous forme de graisses dans le tissu adipeux. Ce stockage conduit au surpoids puis à l'obésité qui peut être classée en différentes catégories en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) (tableau 6).

La prévalence de l'obésité s'accroît de manière telle que l'on parle aujourd'hui d'épidémie d'obésité. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2003, plus d'un milliard de personnes étaient en surpoids et 300 millions étaient cliniquement obèses. Mais déjà, la tendance à l'augmentation de ces statistiques alarmait les autorités. Pourtant, aux Etats-Unis, la prévalence de l'obésité (IMC > 30) est passée d'environ 10% en 1990 à environ 20% en 1999 et a atteint en 2008 une proportion comprise entre 25 et 30%, avec certains états américains dépassant les 30% de personnes obèses. De ce fait, l'épidémie d'obésité a un coût financier important, estimé à presque 150 milliards par an aux Etats-Unis.

La situation en France est moins dramatique mais il y avait 12,4% de la population présentant une obésité en 2006 et 29,2% en surpoids (Virraly, 2006). La tendance à la hausse est aussi importante dans notre pays puisqu'en 2009, 14,5% de la population française était obèse et 31,9% en surpoids (figure 9).

II.1.b Le syndrome métabolique

L'obésité devenant un problème majeur de santé publique, il a été nécessaire de prendre en compte l'ensemble des perturbations métaboliques qui y sont associées afin de faciliter la prise en charge des patients. Cet ensemble de désordres que l'on retrouve chez les patients obèses a été dénommé syndrome métabolique (ou syndrome X ou syndrome d'insulinorésistance).

Tableau 7 : Comparaison des définitions du syndrome métabolique.

OMS	EGSIR	NCEP : ATPIII	IDF
Diabète ou hyperglycémie à jeun ou intolérance au glucose ou IR + 2 ou plus des paramètres suivants :	IR ou hyperinsulinémie à jeun + 2 ou plus des paramètres suivants :	3 ou plus des paramètres suivants :	Tour de taille > 94 cm (homme) et > 80 cm (femme) + 2 ou plus des paramètres suivants :
Obésité : IMC > 30 ou ratio taille/hanche > 0,9 (homme) et > 0,85 (femme)	Obésité : Tour de taille > 94 cm (homme) et > 80 cm (femme)	Obésité : Tour de taille > 102 cm (homme) et > 88 cm (femme)	
Dyslipidémie : TG > 1,7 mM ou HDL-C < 0,9 mM (homme) et < 1,0 mM (femme)	Dyslipidémie : TG > 2,0 mM ou HDL-C < 1,0 mM	Dyslipidémie : TG > 1,7 mM ou HDL-C < 1,0 mM (homme) et < 1,3 mM (femme)	Dyslipidémie : TG > 1,7 mM ou HDL-C < 1,03 mM (homme) et < 1,29 mM (femme)
Hypertension : PA > 140/90 mmHg	Hypertension : PA > 140/90 mmHg et/ou traitement	Hypertension : PA > 135/85 mmHg et/ou traitement	Hypertension : PA > 130/85 mmHg et/ou traitement
Microalbuminurie : Excrétion > 20 µg/min	Glycémie à jeun > 6,1 mM	Glycémie à jeun > 6,1 mM	Glycémie à jeun > 5,6 mM

EGSIR : *European Group for the Study of Insulin resistance*, HDL-C : HDL cholesterol, IDF : *International Diabetes Federation*, IMC : indice de masse corporelle, IR : résistance à l'insuline, OMS : organisation mondiale de la santé, NCEP: *ATPIII* : *National Cholesterol Education program's Adult Treatment Panel III*, PA : Pression artérielle, TG : triglycerides.

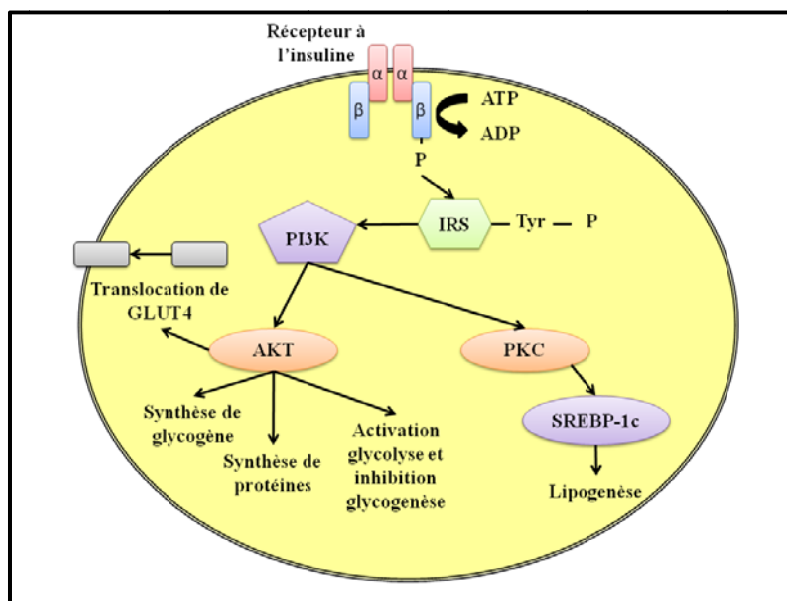


Figure 10 : Schéma de la voie de signalisation de l'insuline.

Après fixation de l'insuline à son récepteur, la sous-unité β de celui-ci s'autophosphoryle et acquiert la capacité de phosphoryler les IRS sur les résidus tyrosine. Ceux-ci activent alors par une cascade de phosphorylation la PI3K puis les *protein kinase B* et *C*. Ces phosphorylations entraînent l'activation de différentes voies métaboliques telles que la lipogenèse, la glycogenogenèse ou la glycolyse.

AKT : *protein kinase B*, IRS : *insulin receptor substrat*, PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*, PKC : *protein kinase C*, SREBP-1c : *sterol regulatory element binding protein 1c*.

Le syndrome métabolique regroupe en général insulinorésistance ou intolérance au glucose, obésité viscérale, dyslipidémie et hypertension. Dans les conditions physiologiques, l'insuline agit aussi bien sur le métabolisme glucidique (stimulation de l'entrée de glucose dans les cellules, de la synthèse de glycogène et inhibition de la néoglucogenèse) que sur le métabolisme lipidique (inhibition de la lipolyse, activation de la lipogenèse) aboutissant globalement à un stockage de l'énergie. L'insulinorésistance et l'altération des métabolismes glucidique et lipidique conduisent à l'apparition d'une multitude de désordres caractéristiques du syndrome métabolique, qui associés, augmentent considérablement le risque de développer des maladies cardiovasculaires (Isomaa et al., 2001, Lakka et al., 2002).

Ce n'est pas avant 1998 que l'idée de donner une définition internationale au syndrome métabolique a été développée. Pour permettre aux cliniciens et aux chercheurs de pouvoir identifier le syndrome métabolique, l'OMS a proposé un certain nombre de critères le caractérisant (Alberti and Zimmet, 1998). Ensuite, aux Etats-Unis, le *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP : ATP III) et, en Europe, l'*European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGSIR) ont formulé leurs définitions (Balkau and Charles, 1999, NCEP, 2001). Plus récemment, l'*International Diabetes Federation* a proposé un consensus pour définir le syndrome métabolique (Alberti et al., 2006). Ces définitions ont des composantes en commun comme l'intolérance au glucose, l'obésité, l'hypertension et la dyslipidémie mais diffèrent par certains critères et détails (tableau 7).

Etant donné l'absence de définition universellement acceptée, les estimations de la prévalence du syndrome métabolique varient entre les études. Cependant, on l'évalue à 24% chez les hommes aux Etats-Unis (Cameron et al., 2004) et à 10% en France (Balkau et al., 2003).

II.2 Physiopathologie de l'insulinorésistance (IR)

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. L'insulinorésistance se définit par une moindre efficacité de l'insuline à jouer son rôle sur ses tissus cibles, ce qui a pour effet de réduire le contrôle du métabolisme glucido-lipidique. Avant de présenter la pathogenèse de l'insulinorésistance, il est nécessaire de présenter la voie de signalisation intracellulaire de l'insuline.

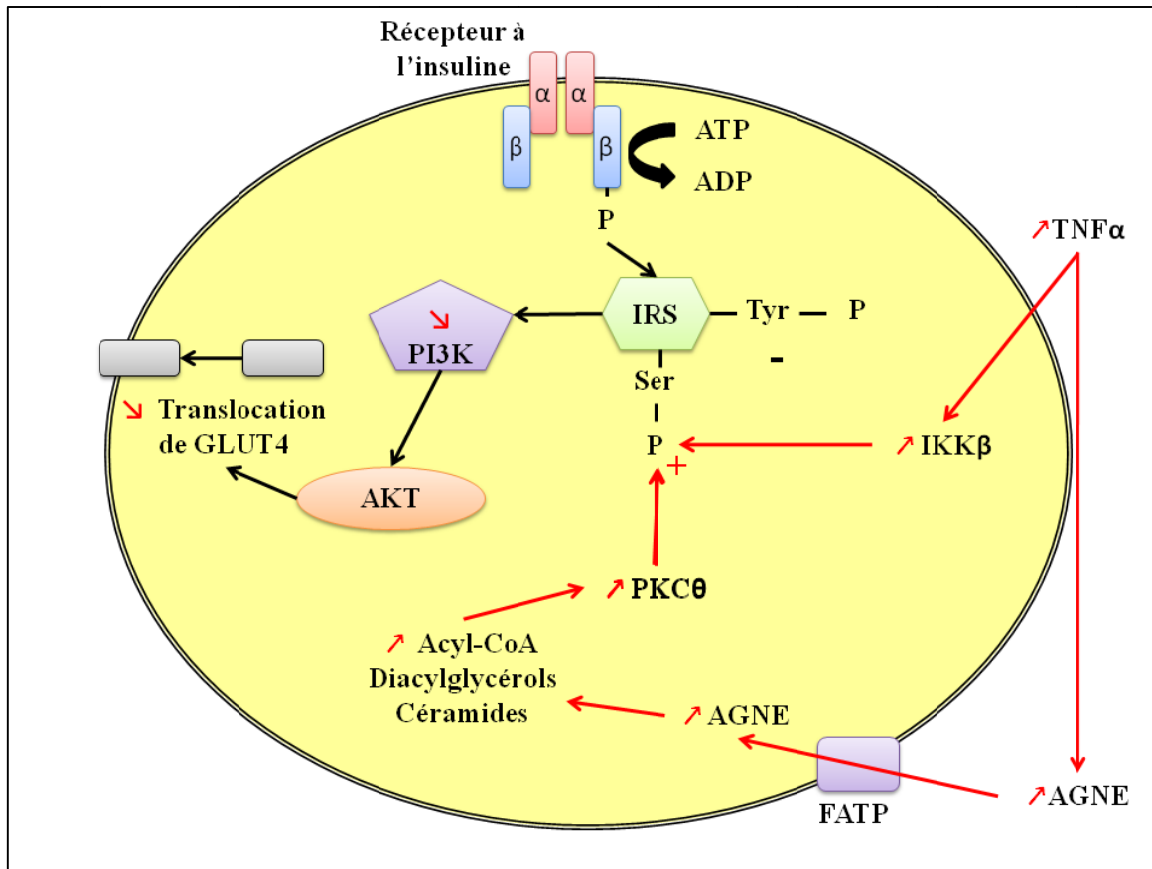


Figure 11 : Altération de la voie de signalisation de l'insuline en cas d'insulinorésistance.

L'augmentation de la concentration plasmatique en AGNE lors de l'obésité entraîne une hausse de la concentration intracellulaire de différents dérivés des acides gras tels que des *acylCoA*, des *diacylglycerols* ou des céramides. Ceux-ci activent la PKCθ qui phosphoryle les IRS sur les résidus sérine et thréonine. Cette phosphorylation a pour conséquence l'inhibition des IRS. De plus, le TNFα active la IKKβ qui phosphoryle également les IRS sur les résidus sérine et thréonine. La conséquence de l'inhibition des IRS est une inhibition de la voie de signalisation de l'insuline, avec entre autre une baisse de la translocation du GLUT4 à la membrane.

AGNE : acides gras non estérifiés, AKT : *protein kinase B*, FATP : *fatty acid transport protein*, IKKβ : *IkappaB kinase β*, IRS : *insulin receptor substrat*, PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*, PKCθ : *protein kinase Cθ*, SREBP-1c : *sterol regulatory element binding protein 1c*, TNFα : *tumor necrosis factor α*.

II.2.a Voie normale de la signalisation de l'insuline

La voie de signalisation de l'insuline est résumée sur la figure 10. L'action de l'insuline dépend d'une cascade de phosphorylations qui débute dès la liaison de l'insuline à son récepteur. Celui-ci est un hétérotétramère constitué de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β (Kido et al., 2001, Belfiore et al., 2009). La liaison de l'insuline à une sous-unité α résulte en un changement de conformation et en une autophosphorylation des sous-unités β grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Les sous-unités β phosphorylées acquièrent une activité tyrosine kinase et vont phosphoryler à leur tour les *insulin receptor substrate* (IRS). Les IRS phosphorylés sont capable de se lier à de nombreuses protéines dont la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) qui, par phosphorylation, active différentes sérine/thréonine kinases telles que la *protein kinase B* (PKB ou Akt), la *protein kinase C* (PKC) et les *phosphoinositol dependent protein kinases 1 et 2* (PIP1 et 2). Via ces différentes protéines, la PI3K promeut la translocation du transporteur de glucose Glut4 à la membrane, la synthèse de protéines, de glycogène et de lipides ou encore contrôle la néoglucogénèse et la lipolyse (Burks and White, 2001).

II.2.b Pathogenèse de l'insulinorésistance

La pathogenèse de l'insulinorésistance implique de nombreux facteurs moléculaires tel que les acides gras non estérifiés (AGNE), le *tumor necrosis factor α* (TNF α) ou encore les différentes cytokines sécrétées par le tissu adipeux (figure 11). L'hypoxie semble également jouer un rôle. Bien qu'il soit évident que l'ensemble de ces facteurs engendrent l'insulinorésistance, ils sont également engendrés par celle-ci. Les perturbations moléculaires et cellulaires peuvent donc être à la fois la cause et la conséquence de l'insulinorésistance. C'est pourquoi il est difficile de réellement définir la ou les causes premières de l'insulinorésistance. Nous allons exposer comment différents facteurs peuvent jouer un rôle dans l'insulinorésistance sans toutefois nous risquer à présenter l'origine exacte de la maladie.

II.2.b.i Acides gras non estérifiés (AGNE) et tumor necrosis factor α (TNF α)

L'obésité se traduit par une augmentation du tissu adipeux par accumulation de lipides. Le tissu adipeux (notamment le tissu adipeux viscéral) produit de grandes quantités de TNF α qui déclenche la lipolyse du tissu adipeux et donc la libération d'AGNE dans la circulation sanguine

(Ruan and Lodish, 2003). Cette augmentation de la concentration plasmatique en AGNE et TNF α est supposée participer à la genèse de l'insulinorésistance. En effet, du fait d'une hausse des acides gras sanguins, les tissus consommateurs d'énergie délaisseraient le glucose au profit de cette source d'énergie plus intéressante physiologiquement (Randle et al., 1963), notamment au niveau du muscle (Boden et al., 1994). Cependant, cette utilisation des AGNE n'est pas suffisante pour en éliminer l'excès et le surplus est stocké dans les tissus sous forme de TG. Du fait d'une moindre utilisation du glucose, une hyperglycémie apparaît ainsi qu'une hyperinsulinémie compensatrice qui peut à terme conduire à un diabète de type 2, à une désensibilisation des récepteurs à insuline et donc à l'insulinorésistance. Encore une fois, il s'agit d'un cercle vicieux car en compensation de cette désensibilisation, l'organisme augmente la synthèse d'insuline ce qui aggrave l'hyperinsulinémie. De même, lorsque l'insulinorésistance commence à s'installer dans le tissu adipeux, la répression de la lipase hormono-sensible par l'insuline se fait de manière moins efficace, ce qui engendre une hausse de la lipolyse et de la concentration plasmatique en AGNE, ce qui entretient et aggrave l'insulinorésistance.

Les AGNE peuvent également induire une insulinorésistance en réduisant l'efficacité de la voie de signalisation de l'insuline (figure 11). En effet, des niveaux élevés d'AGNE conduisent à une accumulation intracellulaire de métabolites tels que le *diacylglycérol* ou les *acylCoA*. Ces métabolites activent la *protein kinase C θ* (PKC θ) qui phosphoryle les résidus sérine et thréonine des IRS (Griffin et al., 1999). Cette phosphorylation limite la phosphorylation des résidus tyrosine et conduit donc à une atténuation de la cascade de réactions normalement provoquée par l'insuline (Wilcox, 2005). De plus, le TNF α est également capable de phosphoryler, via la *IkappaB kinase β* (IKK β), les IRS sur les résidus sérine et thréonine (Wilcox, 2005).

La localisation du tissu adipeux jouerait également un rôle dans l'apparition de l'insulinorésistance. En effet, le tissu adipeux viscéral (développé lors d'une obésité androïde) est réputé plus néfaste que le tissu adipeux sous-cutané (développé lors d'une obésité gynoïde) (Bergman et al., 2006). L'hypothèse portale avance que les AGNE libérés par le tissu adipeux viscéral dans la veine porte exerceraient alors un effet direct sur le foie (Kabir et al., 2005). En cas d'obésité androïde, le foie serait alors le site d'une stéatose et serait le lieu de développement d'une insulinorésistance.

II.2.b.ii Adiponectine et autres adipocytokines

L'adiponectine est une hormone insulino-sensibilisatrice sécrétée uniquement par les adipocytes (Chandran et al., 2003). Elle favorise l'oxydation des acides gras, diminue la synthèse des lipides et réprime la néoglucogenèse dans le foie (Combs et al., 2001, Kershaw and Flier, 2004, Meier and Gressner, 2004). Dans le muscle, elle favorise également l'oxydation du glucose (Fruebis et al., 2001). De plus, l'adiponectinémie est inversement corrélée avec l'obésité et l'insulinorésistance. Diminuant fortement avec l'obésité (Hotta et al., 2000, Weyer et al., 2001), elle augmente avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la perte de poids (Yang et al., 2001).

La leptine a été clonée en 1994 comme étant la protéine issue du gène *ob* dont la mutation est responsable d'une sévère obésité chez les souris *ob/ob* (Ahima and Flier, 2000). La leptine est caractérisée comme étant un signal de suffisance énergétique car elle diminue la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique, améliorant ainsi la sensibilité à l'insuline (Webber, 2003). Les concentrations en leptine sont positivement corrélées avec la masse totale de tissu adipeux (Ahima and Flier, 2000, Fernandez-Galaz et al., 2002). Chez les obèses, il est possible de voir apparaître une hyperleptinémie qui s'accompagne d'une résistance à la leptine (Bluher and Mantzoros, 2009).

La résistine est une autre cytokine synthétisée principalement par le tissu adipeux viscéral. On a montré qu'elle était capable d'induire une sévère insulinorésistance hépatique (Rajala et al., 2003). De plus, la résistine semble être surexprimée en cas d'obésité (Steppan et al., 2001). De ce fait, il a été proposé que la résistine puisse être l'un des liens entre obésité et insulinorésistance. Cependant, bien que les études sur les rongeurs semblent être en accord avec ce postulat (Steppan et al., 2001), celles menées chez l'homme semblent montrer l'absence de ce lien (Meier and Gressner, 2004, Utzschneider et al., 2005).

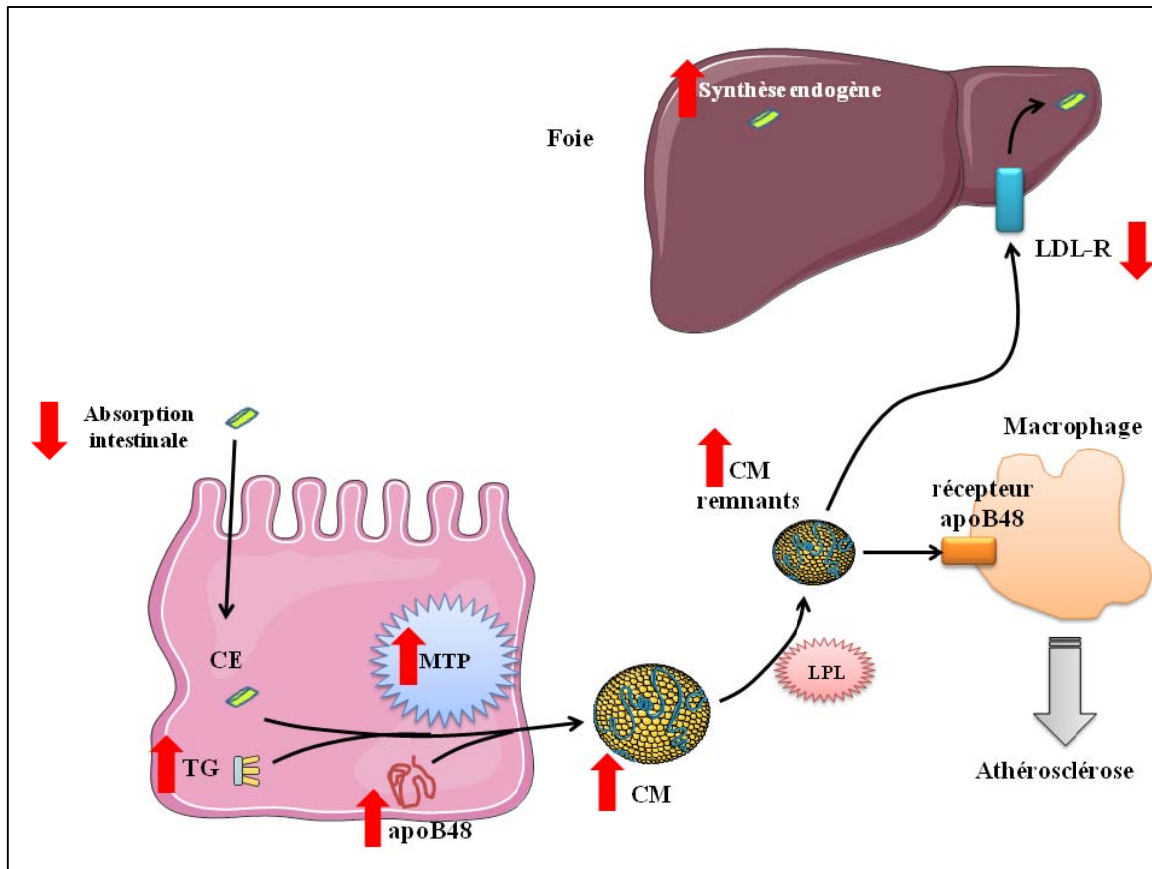


Figure 12 : Conséquences de l'insulinorésistance sur la synthèse intestinale de chylomicrons et sur la voie exogène du cholestérol.

Lors de l'insulinorésistance, il y a une augmentation de la synthèse endogène de cholestérol. L'absorption intestinale du cholestérol diminue en rapport. De plus, du fait de la lipolyse accrue, l'excès d'AGNE dans le plasma entraîne une hausse de la synthèse de triglycérides. Au niveau de l'entérocyte, cette synthèse plus élevée entraîne, du fait également d'une expression de l'apoB48 et d'une activité de la MTP plus élevées, une augmentation de la synthèse de CM, et par conséquent de la formation CM remnants. L'insulinorésistance a également pour effet de réduire l'activité du *LDL receptor*. Les CM remnants sont donc moins captés par le foie et sont pris en charge par les macrophages. Ceux-ci se chargent alors en lipides, intègrent la paroi des vaisseaux et entraînent le développement de l'athérosclérose.

CE : cholestérol estérifié, CM : chylomicrons, LDL-R : *LDL receptor*, LPL : *lipoprotein lipase*, MTP : *microsomal triglyceride transfer protein*, TG : triglycérides.

II.3 La dyslipidémie associée à l'insulinorésistance

L'une des conséquences majeure de l'insulinorésistance est l'apparition d'une dyslipidémie spécifique entraînant une forte augmentation du risque cardiovasculaire (Ginsberg et al., 2006), et caractérisée par des taux plasmatiques élevés de TG et de VLDL, des LDL enrichies en cholestérol, plus petites et plus denses que les LDL normales, ainsi que par une diminution de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol.

II.3.a Effets sur les lipoprotéines à apoB100

L'hypertriglycéridémie observée chez les patients insulinorésistants s'explique notamment par une lipolyse accrue qui conduit à une augmentation de la concentration plasmatique en AGNE, entraînant une surproduction de TG et VLDL (figure 12 et 13). En effet, la MTP qui permet de transfert des lipides vers l'apoB100 et l'apoB48 est plus exprimée et plus active chez les patients insulinorésistants (Qiu et al., 2005). De plus, l'augmentation du flux d'AGNE stimule les synthèses hépatique et intestinale de TG et impose donc le transfert des lipides sur l'apoB100 et l'apoB48 ainsi que leur stabilité.

L'hypertriglycéridémie serait également liée à la baisse d'activité de la LPL. En situation d'insulinorésistance, la LPL est moins activée par l'insuline. Il y a par conséquent une moindre hydrolyse des VLDL ce qui entraîne une augmentation de la concentration plasmatique des TG des VLDL. Celle-ci pourrait être également liée à l'apoCIII, apolipoprotéine connue pour réprimer l'activité de la LPL (Florez et al., 2006). Le promoteur du gène de l'apoCIII possède en effet un élément de réponse à l'insuline qui entraîne une répression de son expression (Dallinga-Thie et al., 2001). Une sensibilité à l'insuline diminuée peut donc favoriser l'expression du gène de l'apoCIII et donc une inhibition de la LPL.

Par le biais des échanges via la CETP, les LDL s'enrichissent en EC alors que les HDL s'enrichissent en TG. Ces HDL riches en TG sont plus sensibles à l'action de la HL et voient donc leur catabolisme s'accélérer. De plus, les LDL enrichies en EC et dont les TG sont hydrolysés par la LPL ou la HL deviennent plus petits et plus denses (Tan et al., 1995), et favorisent l'athérosclérose.

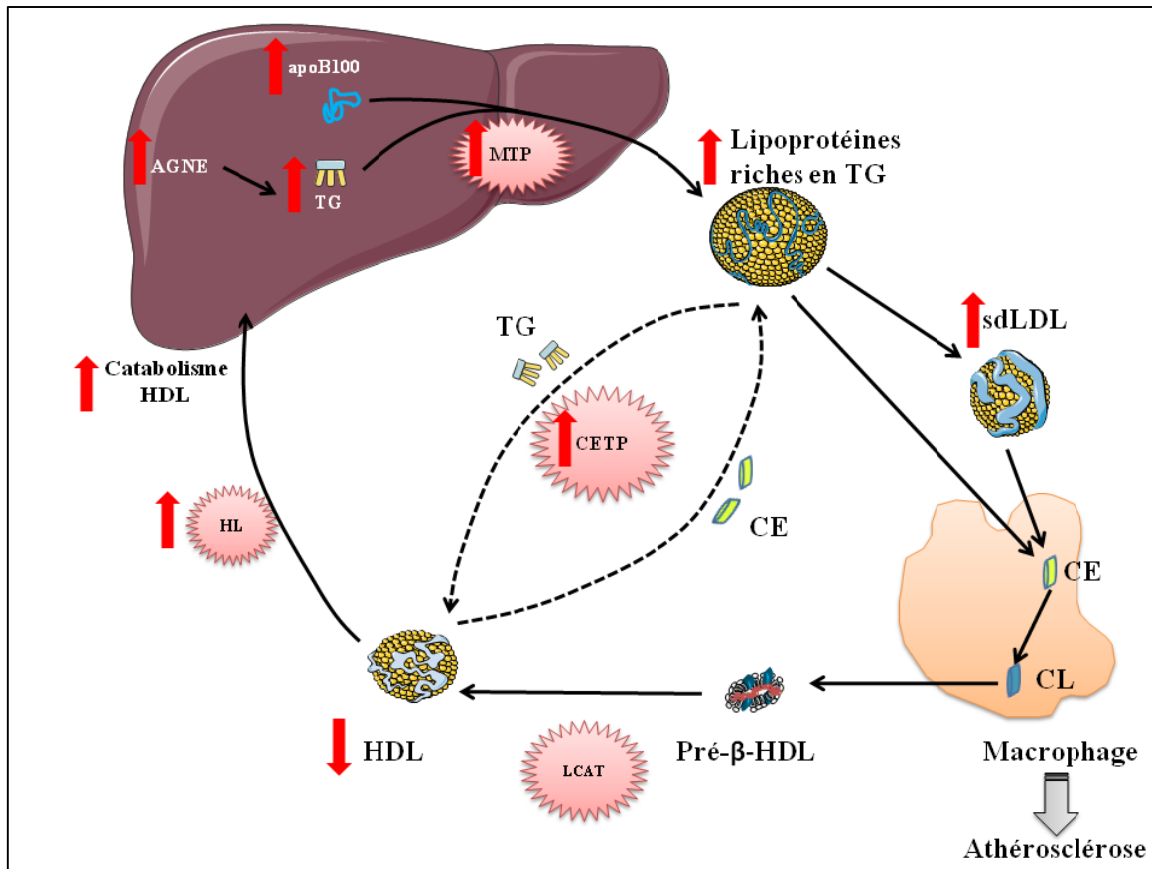


Figure 13 : Conséquences de l'insulinorésistance sur le métabolisme des lipoprotéines, voie endogène et transport inverse du cholestérol.

La hausse de la lipolyse intra-adipocytaire provoquée par l'insulinorésistance entraîne une hausse de la concentration plasmatique en AGNE. Il y a par conséquent une synthèse accrue de TG au niveau du foie. Associée à la plus forte synthèse d'apoB100 et à l'activité accrue de la MTP, la synthèse hépatique de VLDL est augmentée. La plus forte activité de la CETP entraîne un enrichissement des VLDL et LDL en CE alors que les HDL s'appauvrissent en CE mais s'enrichissent en TG. Les LDL riches en CE sont plus petites et plus denses. Elles sont captées par les macrophages qui, insérés dans les parois de vaisseaux, induisent l'athérosclérose. Les HDL enrichies en TG subissent plus facilement une hydrolyse de la part de la HL ce qui a pour conséquence d'accélérer leur métabolisme et de réduire la concentration plasmatique en HDL.

AGNE : acides gras non estérifiés, CE : cholestérol estérifié, CETP : *cholesteryl ester transfer protein*, CL : cholestérol libre, HL : lipase hépatique, LCAT : *lecithin cholestérol acyltransferase*, MTP : *microsomal triglyceride transfer protein*, sdLDL : LDL petites et denses, TG : triglycérides

II.3.b Effets sur le transport inverse du cholestérol

La figure 13 présente les effets de l'insulinorésistance sur l'ensemble des différentes étapes du transport inverse du cholestérol.

II.3.b.i Efflux de cholestérol et insulinorésistance

Les études *in vitro* d'efflux de cholestérol suggèrent que celui-ci est maintenu à un niveau normal chez les patients insulinorésistants (Dullaart and van Tol, 2001). Cet efflux est positivement corrélé aux PL des HDL (Dullaart and van Tol, 2001) et une augmentation des PL sanguins est associée à l'hypertriglycéridémie des patients insulinorésistants (Fournier et al., 2001). Cette hausse des PL plasmatiques peut donc favoriser l'efflux de cholestérol et le maintenir à un niveau normal. Cependant, on notera aussi que, en situation de syndrome métabolique, l'hyperglycémie semble diminuer l'efficacité de l'efflux (Syvanne et al., 1996, de Vries et al., 2008).

En ce qui concerne l'apoAI, on a montré par des études cinétiques que, dans le syndrome d'insulinorésistance, sa baisse n'est pas liée à une altération de sa production. En effet, celle-ci a été décrite comme n'étant pas affectée par l'insulinorésistance (Frenais et al., 2001a, Pont et al., 2002), ou bien augmentée (Batista et al., 2004). Comme détaillé ultérieurement, la diminution de l'apoAI semble plutôt liée à un hypercatabolisme observée dans les états insulinorésistants.

II.3.b.ii Remodelage des HDL et insulinorésistance

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

La lecithin : cholesterol acyltransferase (LCAT)

Il est connu que la triglycéridémie influe sur l'estérification du cholestérol (Murakami et al., 1995). Il est donc normal d'observer une plus forte activité LCAT chez des patients hypertriglycéridémiques (Tato et al., 1997). Cet accroissement de l'activité a également été retrouvé chez des patients insulinorésistants présentant un diabète de type 2 (Riemens et al., 1998a) ou non (Riemens et al., 1999b).

La lipoprotein lipase (LPL)

La LPL est activée par l'insuline. Il est donc normal que son activité soit diminuée lors d'une insulinorésistance (Knudsen et al., 1995), ce qui favorise une hausse des VLDL plasmatiques.

La lipase hépatique (HL)

Chez l'homme (comme pour l'ensemble des modèles animaux), l'activité de la HL est fortement augmentée en situation d'insulinorésistance (Baynes et al., 1991, Riemens et al., 1999a). Cette activité accrue permettrait d'accélérer le catabolisme des HDL riches en TG.

La cholesterol ester transfer protein (CETP)

L'activité CETP est fortement augmentée en cas d'hypertriglycémie (Guerin et al., 2001, Riemens et al., 1998a). Cette activité accrue modifie les caractéristiques des lipoprotéines, les rendant notamment plus athérogènes :

- Les VLDL enrichies en EC sont capturées par les macrophages qui s'introduisent par la suite dans les parois vasculaires et entraînent le développement de l'athérosclérose.
- Les HDL riches en TG sont hydrolysées par la HL ce qui les rend instables et plus facilement catabolisables.
- Les LDL riches en TG et EC, petites et denses, sont également athérogènes.

La phospholipid transfer protein (PLTP)

Les études menées chez l'homme montrent que l'activité PLTP est plus élevée chez les patients insulinorésistants (Riemens et al., 1998b, Riemens et al., 1999b, Jonkers et al., 2003), ce qui participerait au maintien de l'efflux de cholestérol. En effet, en enrichissant les HDL en PL, la PLTP favoriserait l'efflux et compenserait partiellement la baisse de l'efflux secondaire à la réduction du HDL-cholestérol.

II.3.b.iii Catabolisme des HDL et insulinorésistance

Bien que le catabolisme des HDL soit augmenté, les données sur les récepteurs des HDL en situation d'insulinorésistance sont peu nombreuses. Dans la mesure où, chez l'homme, le retour du cholestérol au foie se fait en très grande majorité via les transferts par la CETP, les

effets de l'insulinorésistance sur la capture sélective ont été très peu étudiés. Les modèles animaux ont apporté des informations parfois contradictoires. En effet, une baisse de l'expression hépatique du SR-BI a été montrée chez la souris *ob/ob* (Lundasen et al., 2003) mais, chez le rat insulinorésistant, cette même expression est augmentée (Roberts et al., 2004). En ce qui concerne les autres récepteurs mis en jeu dans le catabolisme des HDL et du cholestérol, il semblerait qu'aucune étude n'ait pour le moment été menée pour caractériser d'éventuelles modifications en situation d'insulinorésistance.

II.4 Situation chez le chien

A la lecture de la littérature plus qu'abondante sur le sujet, il ne fait aucun doute que l'obésité est associée à de nombreuses perturbations endocriniennes, métaboliques ou cardiovasculaires. Cependant, ces études menées chez l'homme n'apportent que très peu d'explications sur les mécanismes sous-jacents. De plus, les résultats de ces études sont souvent parcellaires ou contradictoires du fait d'une forte hétérogénéité au sein des groupes de patients. Pour des raisons éthiques évidentes, il est impossible d'étudier chez l'homme les mécanismes physiopathologiques associés à l'obésité. C'est pourquoi il a été nécessaire de développer un modèle animal, alliant faisabilité et reproductibilité, et pouvant développer une obésité et une insulinorésistance par manipulation nutritionnelle. De plus, ce modèle devait permettre des investigations itératives d'un même individu ainsi que la réalisation de protocoles de longue durée. Dans ce but, des investigations ont été menées au laboratoire chez le chien car les études préexistantes avaient montré que cet animal présentait quelques caractéristiques nécessaires à un bon modèle.

II.4.a Mise en place de l'obésité et de l'insulinorésistance

En prenant en compte tous les travaux existant (Rocchini et al., 1997, Rocchini et al., 2004, Mittelman et al., 2002, Kim et al., 2003), le laboratoire a développé un modèle de chien obèse et insulinorésistant en veillant à la qualité et la cohérence physiologique des régimes utilisés et en ne cherchant pas une prise de poids trop rapide afin de mimer au plus près l'établissement de la pathologie humaine.

Dans une 1^{ère} étude (Bailhache et al., 2003b, Gayet et al., 2004a), des chiens Beagle mâles ont reçu un régime dans lequel 54% des calories étaient d'origine lipidique et 24% d'origine protéique. L'apport alimentaire couvrait 1,9 fois les besoins d'entretien initiaux, estimés à 130 kcal d'énergie métabolisable/kg^{0,75}/j (NRC, 1985). Ces animaux ont eu un gain de poids de 43 ± 5% sur une période de 6 à 9 mois. Par la méthode du clamp euglycémique hyperinsulinémique, il a été confirmé que ces animaux présentaient une insulinorésistance. Un 2^{ème} régime (Gayet et al., 2003, Gayet et al., 2004b), moins hyperlipidique puisque les lipides correspondaient à 45% des calories, a par la suite été donné à des chiennes ovariectomisées à hauteur de 1,4 fois les recommandations. Ces animaux ont eu un gain de poids d'environ 44 ± 5% sur une période de 18 mois. Tout comme les études préalables, ce protocole a confirmé que, chez le chien, l'obésité est associée à une insulinorésistance. Enfin, la dernière étude en date (Serisier et al., 2008) a porté sur un régime où 55% des calories provenaient des lipides. Les animaux ont reçu quotidiennement 1,6 fois leurs besoins énergétiques. Les animaux obèses et insulinorésistants obtenus ont permis de montrer que le gain de poids provenait essentiellement d'un gain de masse grasse alors que la masse maigre n'évoluait que très peu. Ces différentes études menées au laboratoire ont permis de démontrer l'existence d'une insulinorésistance associée à l'obésité chez le chien. De nombreuses autres perturbations métaboliques ont été également mises en évidence.

II.4.b Conséquences métaboliques de l'insulinorésistance chez le chien

Ces perturbations métaboliques mises en évidence chez le chien obèse et insulinorésistant sont de deux types. Premièrement, il a été montré que l'obésité s'accompagnait d'une dyslipidémie que de nombreuses études ont permis de bien caractériser et, deuxièmement, que l'obésité conduit également à des perturbations cellulaires et hormonales.

II.4.b.i La dyslipidémie associée à l'obésité chez le chien

L'hypertriglycéridémie est la plus commune des anomalies du métabolisme lipidique associée à l'insulinorésistance, y compris chez l'homme. L'ensemble des études menées au laboratoire a montré une forte augmentation de la concentration plasmatique des TG chez les chiens obèses (Bailhache et al., 2003a, Bailhache et al., 2003b, Serisier et al., 2008). Ces mêmes études ont montré que celle-ci s'expliquait principalement par une forte hausse des TG dans les VLDL mais que l'on trouvait également une augmentation des TG des HDL.

Afin d'apporter une ou des explications mécanistiques, le métabolisme des lipoprotéines à apoB100 (VLDL et LDL) a été caractérisé chez le chien sain puis chez le chien obèse et insulinorésistant grâce à une approche cinétique par marquage isotopique suivi d'une modélisation informatique. Le chien étant dépourvu d'IDL et de CETP, ces études cinétiques sont nettement plus accessibles que chez l'homme pour lequel le système de modélisation doit prendre en compte l'ensemble des échanges entre lipoprotéines. Chez le chien sain, l'apoB100 entre dans la circulation plasmatique exclusivement par les VLDL (Bailhache et al., 2004), avec une production correspondant à deux fois celle de l'homme (Beltz et al., 1985). Néanmoins, le catabolisme très élevé (5 à 7 fois celui de l'homme) a pour conséquence une très faible concentration plasmatique en apoB100 au sein des VLDL. Ce catabolisme se répartit entre 25% de capture directe des particules par le foie et 75% de VLDL transformées en LDL. Cette conversion est la seule source de LDL chez le chien (Bailhache et al., 2004). L'apoB100 des LDL a un métabolisme (production, catabolisme, concentration) similaire chez le chien et chez l'homme (Kovanen et al., 1981, Mahley et al., 1981).

Chez le chien obèse et insulinorésistant, des études similaires ont montré que la concentration en apoB100 est significativement supérieure dans les VLDL mais plus faible dans les LDL en comparaison aux mesures effectuées chez les chiens sains (Briand et al., 2008). Les analyses du renouvellement des apolipoprotéines en fonction du temps ont établi que la production d'apoB100-VLDL est plus élevée chez les animaux obèses alors que le catabolisme des VLDL est inchangé. Cependant, la lipolyse des VLDL est significativement diminuée. En ce qui concerne les LDL, en plus de la baisse de la production des LDL via la lipolyse des VLDL, la diminution de la concentration en apoB100 dans les LDL s'explique principalement par une forte augmentation du catabolisme. Ces études ont permis de mettre en évidence que les mécanismes conduisant à l'hypertriglycéridémie chez le chien sont similaires à ceux précédemment observés chez l'homme (Duvillard et al., 2000, Pont et al., 2002).

En ce qui concerne le transport inverse du cholestérol, du fait de l'absence d'activité CETP (Bailhache et al., 2004, Ouguerram et al., 2004), l'analyse du métabolisme de l'apoAI et du cholestérol associé aux HDL peut être réalisée par une modélisation monocompartmentale simple. Les études sur les chiens sains ont montré que la capture sélective du cholestérol via le SR-BI représente environ 60% du retour du cholestérol au foie (Bailhache et al., 2004, Ouguerram et al., 2004), ce qui confère au chien une caractéristique très originale. En effet, chez

l'homme, cette voie ne représente que 11% du turnover alors que les transferts dépendants de la CETP en représentent 82%. Chez les chiens, comme chez l'homme, le HDL-cholestérol a été diminué lors de l'installation de l'obésité et de l'insulinorésistance (Bailhache et al., 2003a). Il s'agit là d'un paradoxe dans la mesure où ce phénomène est expliqué chez l'homme par une augmentation des échanges via la CETP du fait de l'hypertriglycéridémie. L'activité CETP n'ayant pas été mise en évidence chez le chien, cette baisse de HDL-cholestérol ne peut s'expliquer de cette façon. Il est donc possible que la production ou le catabolisme des HDL soit affecté par l'insulinorésistance chez le chien. Nous avons montré que les concentrations en apoAI au sein des HDL ne changeaient pas chez les chiens, la production et le catabolisme étant tout les deux augmentés (Briand et al., 2007). La concentration en EC des HDL diminue avec l'obésité et l'insulinorésistance du fait d'une baisse significative de la production et du catabolisme. De plus, la capture sélective des EC par le SR-BI diminue chez les chiens obèses suggérant une réduction du transport inverse du cholestérol.

II.4.b.ii Autres perturbations associées à l'obésité chez le chien

L'obésité canine s'accompagne d'une hausse de la concentration plasmatique en AGNE (Gayet et al., 2004a, Bailhache et al., 2003a), phénomène que l'on observe également chez l'homme. De plus, on observe une hausse des concentrations plasmatiques d'*insulin like growth factor 1* (IGF1) et de TNF α (Gayet et al., 2004a). L'hyperproduction de TNF α par l'adipocyte chez le sujet obèse est bien connue. Bien qu'il ait été montré que le TNF α peut induire l'insulinorésistance (Hotamisligil, 1999), il est impossible de déterminer si cette hausse de TNF α est une cause ou une conséquence (ou les deux) de l'insulinorésistance. Quoiqu'il en soit, cette hausse de TNF α favorise la pathologie.

En ce qui concerne les niveaux d'expression des gènes, la LPL, le PPAR γ , l'adiponectine et le GLUT4 présentent une diminution de leurs expressions dans le tissu adipeux viscéral chez le chien (Gayet et al., 2007, Leray et al., 2004) alors que l'expression de la leptine est augmentée. De plus, les expressions musculaires de la LPL et du GLUT4 sont également plus faibles. Ces modifications métaboliques sont couramment retrouvées chez l'homme obèse et insulinorésistant. Le chien suralimenté, obèse et insulinorésistant, constitue donc un bon modèle de la pathologie humaine, notamment parce qu'il développe des perturbations métaboliques, tant plasmatiques que moléculaires, similaires à celles retrouvées chez l'homme.

III. Modulation de la dyslipidémie par des facteurs nutritionnels ou pharmacologiques

Du fait de la hausse de la prévalence des MCV, diverses molécules pharmacologiques ont été synthétisées afin de réduire les facteurs de risque cardiovasculaires, au premier rang desquels se situe la dyslipidémie. Les statines ont tout d'abord permis de réduire la cholestérolémie ainsi que le LDL-cholestérol par leur action sur la *HMG-CoA réductase*, enzyme clé de la synthèse endogène du cholestérol. Les fibrates, agonistes du PPAR α , permettent de réduire les TG et le LDL-cholestérol, mais également d'augmenter légèrement le HDL-cholestérol. Nous allons maintenant présenter comment des molécules naturelles (acide nicotinique et acides gras polyinsaturés oméga 3) peuvent permettre de lutter contre la dyslipidémie.

III.1 L'acide nicotinique (AN)

L'acide nicotinique (AN) (ou niacine ou vitamine B3) est une vitamine hydrosoluble. Il s'agit d'un noyau pyridine substitué par un groupement acide carboxylique en position β . Elle est aussi appelée vitamine PP pour *Pellagra Preventive* car une carence en cette vitamine est responsable de la pellagre, affection caractérisée notamment par un amaigrissement, une dermatite, une diarrhée et une démence. Les sources naturelles d'AN sont les viandes, les levures, le blé ou encore le riz. Les besoins journaliers en AN sont d'environ 20 mg chez l'homme (Bowman and Rusell, 2001), alors que chez le chien, ils ont été estimés à environ 0,45 mg/jour/kg^{0,75} (Case et al., 2000). L'AN est le précurseur du NAD (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) et du NADP (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), deux cofacteurs impliqués dans de nombreuses réactions biochimiques essentielles.

III.1.a Données cliniques

L'AN joue son rôle de vitamine lorsque l'apport journalier est de l'ordre de la dizaine de milligrammes. Cependant, apporté à hauteur du gramme, l'AN possède des effets puissants, notamment sur les lipides plasmatiques. Ces propriétés pharmacologiques ont été mises en évidence au milieu du 20^{ème} siècle par Altschul et al. (1955), qui ont montré que l'AN était un puissant agent hypocholestérolémiant chez le lapin. Cependant, l'utilisation de l'AN en clinique a

Tableau 8 : Comparaison des effets de différents agents thérapeutiques dans le traitement des dyslipidémies (Davidson, 2006).

Molécules	Changement (%)		
	LDL-C	HDL-C	Triglycérides
Statines	-18 à -55	+5 à +15	-7 à -30
Séquestrant des acides biliaires	-15 à -30	+3 à +5	Pas de changement
Acide nicotinique	-5 à -25	+15 à +35	-20 à -50
Fibrates	-5 à -20	+10 à +20	-20 à -50

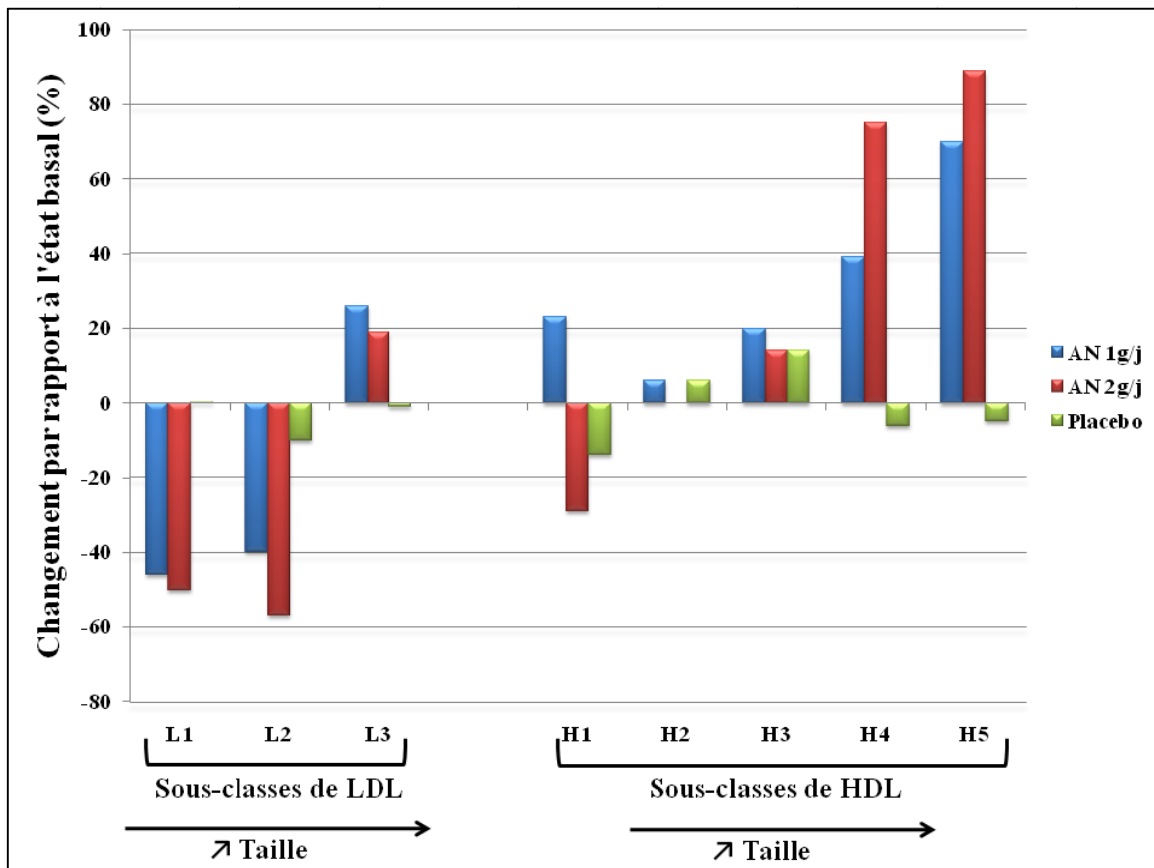


Figure 14 : Effets de l'acide nicotinique sur les différentes sous-classes de LDL et HDL (Morgan et al., 2003).

été pendant longtemps assez anecdotique en raison d'effets secondaires assez importants. Parmi eux, le flush (bouffées vasodilatatrices), qui se caractérise par une sensation de chaleur et des rougeurs cutanées, est celui le plus couramment ressenti par les patients. La formulation récente d'une nouvelle forme d'administration de l'AN, dont la libération dans l'organisme se fait de manière prolongée, diminuant fortement la prévalence des effets secondaires, a remis l'AN au centre de l'attention. Ce médicament est maintenant prescrit dans le traitement des dyslipidémies, en particulier chez les patients atteints d'une dyslipidémie mixte ou combinée, caractérisée par des concentrations plasmatiques élevées de LDL-cholestérol et de TG, et de faibles concentrations de HDL-cholestérol, ainsi que chez les patients atteints d'hypercholestérolémie primaire.

Les effets généraux de l'AN sont une baisse des TG, du cholestérol total et du LDL-cholestérol. Cependant, la particularité de l'AN se situe dans sa capacité à augmenter fortement le HDL-cholestérol, et ce de manière bien plus marquée que l'ensemble des autres molécules existantes (tableau 8) (Gille et al., 2008, Kamanna and Kashyap, 2008). L'AN permet donc d'améliorer l'ensemble des paramètres de la dyslipidémie associée à l'insulinorésistance. Morgan et al. (2003) ont tenté de caractériser les effets de l'AN sur les différentes sous-classes de lipoprotéines. Ils ont montré que la baisse du LDL-cholestérol s'explique principalement par une diminution des LDL petites et denses, les LDL les plus athérogènes (Austin et al., 2000, Gardner et al., 1996, Lamarche et al., 1998), alors que les LDL plus larges augmentent légèrement (Figure 14). En ce qui concerne les HDL, l'AN entraîne une diminution des particules de petite taille et augmente fortement les HDL de grande taille (figure 14) qui ont été caractérisées comme antiathérogènes (Griffin et al., 1988, Johansson et al., 1991). Parallèlement, l'AN réduit la progression de l'athérosclérose et diminue la survenue des maladies cardiovasculaires (Taylor et al., 2004). Le « shift » dans les différentes sous-classes de LDL et HDL peut en partie expliquer les effets bénéfiques de l'AN sur l'athérosclérose.

III.1.b Effets et mécanisme d'action

III.1.b.i Le récepteur GPR109A

En 2003, plusieurs groupes ont publié des études montrant que le récepteur orphelin GPR190A était activé par l'AN à des concentrations voisines de celles utilisées en clinique

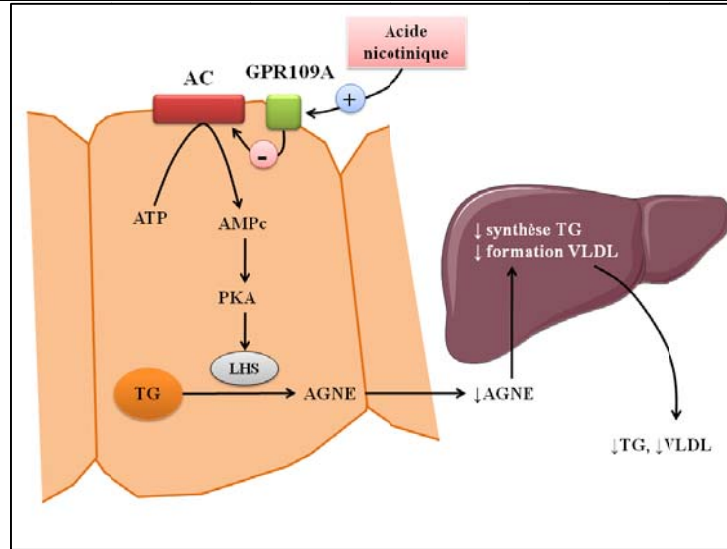


Figure 15 : Effets métaboliques de l’acide nicotinique à doses pharmacologiques sur la lipase hormono-sensible.

La liaison de l’AN sur le récepteur GPR109A entraîne l’inhibition de l’*adenylate cyclase* et réduit la formation d’AMPc. Ce dernier ne peut donc pas activer la *protein kinase A* et par conséquent la LHS. De ce fait, il y a une moindre hydrolyse des TG et une baisse de la concentration plasmatique en AGNE.

AC : *adenylate cyclase*, LHS : lipase hormono-sensible, PKA : *protein kinase A*, TG : triglycérides.

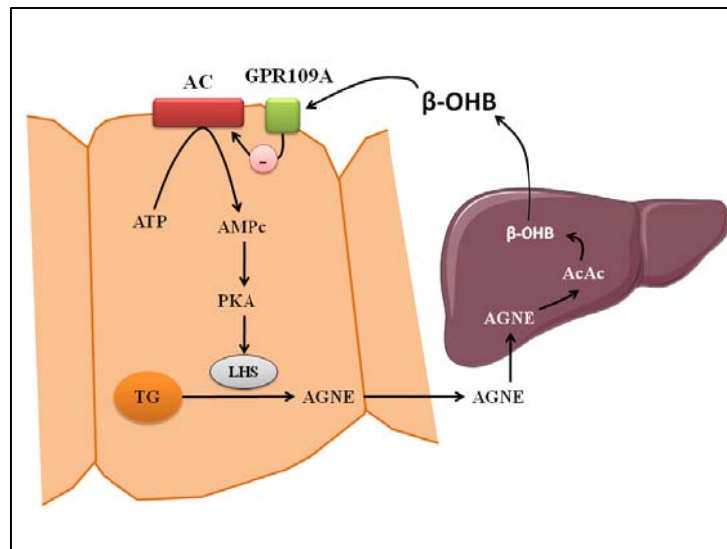


Figure 16 : Rôle physiologique potentiel du β -hydroxybutyrate et du récepteur GPR109A en période de jeûne.

En situation de jeûne, un trop grand relargage d’AGNE dans le sang entraîne la formation d’acétoacétate et de β -hydroxybutyrate dans le foie. Le β -hydroxybutyrate inhibe l’*adenylate cyclase* via la récepteur GPR109A et par conséquent réduit la lipolyse et la libération d’AGNE.

AC : *adenylate cyclase*, AcAc : acétoacétate, β -OH : β -hydroxybutyrate, LHS : lipase hormono-sensible, PKA : *protein kinase A*, TG : triglycérides.

(Wise et al., 2003, Soga et al., 2003, Tunaru et al., 2003). Ce récepteur, exprimé dans le tissu adipeux (blanc et brun) ainsi que dans la rate et les cellules immunitaires (Soga et al., 2003, Tunaru et al., 2003), est couplé avec une protéine G inhibitrice. L'activation de celle-ci entraîne une inhibition de l'*adenylate cyclase* qui conduit à une réduction du taux intracellulaire d'AMPc (Aktories et al., 1980), et par conséquent, de la *protein kinase A* sous forme active. De ce fait, il y a une moindre activation de la lipase hormono-sensible et donc de la lipolyse (figure 15). Il semblerait que le β -hydroxybutyrate puisse être un des ligands naturels de ce récepteur (Gille et al., 2008). En effet, ce corps cétonique, produit pendant le jeûne du fait d'une concentration plasmatique en AGNE trop importante, inhiberait la lipolyse (figure 16) via ce récepteur et l'inhibition de l'*adenylate cyclase* (Taggart et al., 2005). A l'heure actuelle, aucun analogue chimique de l'AN n'a été mis sur le marché. Cependant, de nombreux composés sont actuellement en cours de développement préclinique et pourraient aboutir à l'obtention de molécules efficaces ne possédant pas les effets secondaires de l'AN (Jung et al., 2007, Semple et al., 2008, Shen, 2009, Skinner et al., 2007).

III.1.b.ii AN et AGNE

Bien que l'inhibition de la lipolyse intra-adipocytaire ait été en premier lieu le mécanisme avancé pour expliquer la correction des concentrations en lipides plasmatiques, il semblerait que ce ne soit pas la seule explication. En effet, l'AN provoque une rapide diminution de la concentration plasmatique en AGNE, mais 2 à 3h après l'administration d'AN, un rebond de celle-ci est observé (Dhalla et al., 2007, Wang et al., 2000), alors que sur le long terme, il n'a pas été montré de modification de cette concentration (Vega et al., 2005). Ceci suggère donc l'implication d'autres mécanismes pouvant expliquer les effets hypotriglycéridémians de l'AN.

III.1.b.iii AN et lipoprotéines à apoB100

L'AN permet la réduction des lipoprotéines à apoB100. En effet, *in vitro*, l'AN inhibe l'activité de la *diacylglycérol acyltransférase 2* (DGAT2), enzyme clé de la synthèse des TG (Ganji et al., 2004). En parallèle à la possible inhibition de la LHS et de la disponibilité des AGNE, l'AN entraîne une importante réduction des TG nécessaires à la synthèse endogène de VLDL. En ce qui concerne l'apoB100, l'AN favorise sa dégradation (Jin et al., 1999). Le mécanisme impliqué n'est pas connu mais on peut supposer que la diminution des TG

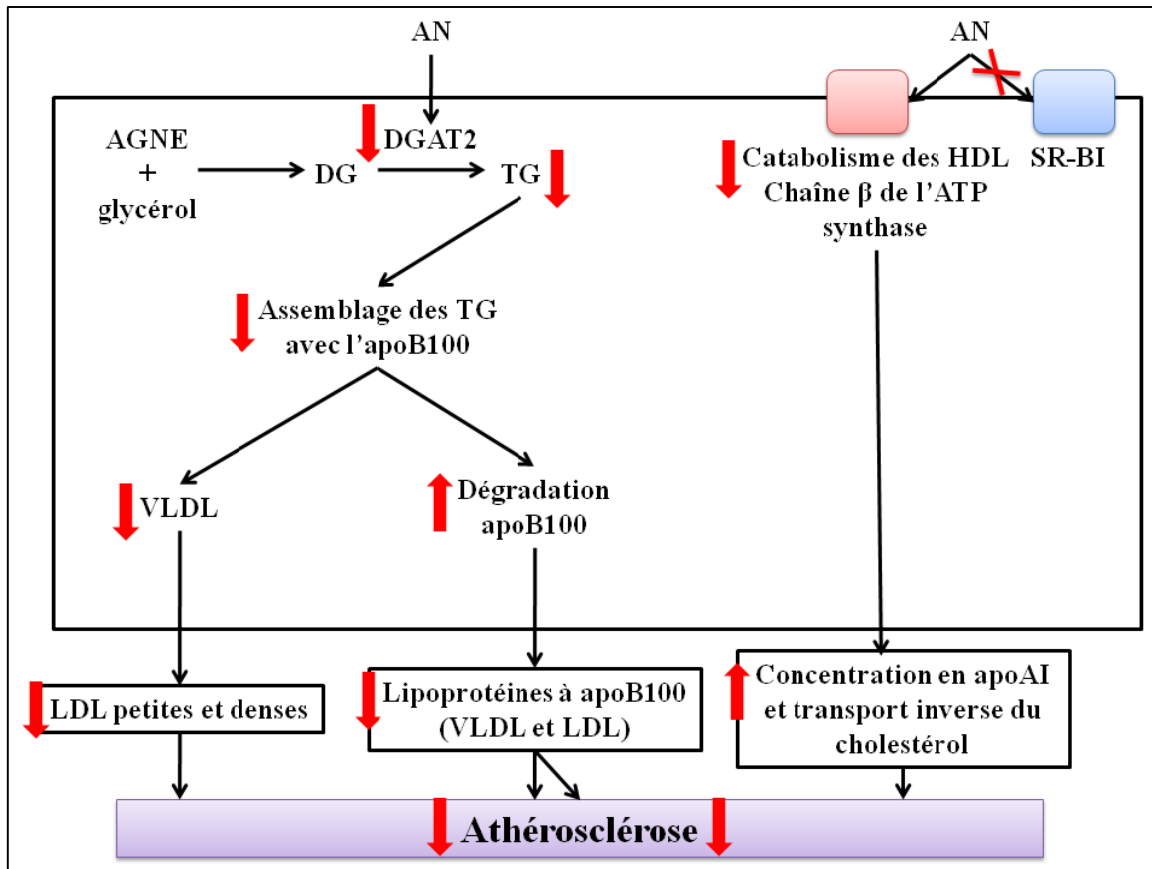


Figure 17 : Mode d'action supposé de l'acide nicotinique sur le métabolisme des LDL et HDL dans le foie (Kamanna and Kashyap, 2008).

Chez l'homme, l'AN inhiberait la DGAT et la synthèse endogène des TG. De ce fait, il y a une réduction de la concentration plasmatique en VLDL et LDL. De plus, l'AN réduit le catabolisme des HDL, augmente la concentration plasmatique en apoAI et améliore le transport- inverse du cholestérol. L'AN ne semble pas agir sur le SR-BI.

AGNE : acide gras non estérifié, AN : acide nicotinique, DG : diglycérider, DGAT2 : *diacylglycerol acyltransferase 2*, SR-BI : *scavenger receptor class B type I*, TG : triglycérider.

entraîne la dégradation de l'apoB100 par manque de substrat. L'AN entraîne une diminution de la production de VLDL-TG chez des femmes saines (Wang et al., 2001b), ainsi que chez des sujets obèses présentant une stéatose hépatique (Fabbrini et al., 2010). Cependant, cet effet n'a pas été retrouvé chez des patients hypertriglycéridémiques (Lamon-Fava et al., 2008). Cette dernière étude a également montré une réduction de l'apoB100-VLDL, expliquée par une tendance à l'augmentation de son catabolisme sans changement de sa production. Le métabolisme de l'apoB100 des LDL n'était pas modifié par le traitement à l'AN dans cette étude.

III.1.b.iv AN et TIC

L'AN augmente l'expression du PPAR α et de l'ABCA1 dans les cellules HepG2 (Siripurkpong and Na-Bangchang, 2008) ou les macrophages (Rubic et al., 2004). Il est donc possible qu'il favorise l'efflux de cholestérol *in vivo*. On a d'ailleurs montré une augmentation de cet efflux dans des hépatocytes de lapins hypercholestérolémiques (Zhao et al., 2008), efflux qui semble être régulé par différents facteurs nucléaires (PPAR α , PPAR γ et LXR α). De plus, l'AN entraîne une hausse des concentrations plasmatiques en HDL et apoAI, due en partie à une baisse de la capture hépatique de l'apoAI (Jin et al., 1997), sans implication du SR-BI (Nieland et al., 2007). Il est possible que cette moindre capture soit due à l'inhibition de la chaîne β de l'*ATP synthase* (Zhang et al., 2008). De plus, il semble que la CETP pourrait jouer un rôle important puisque chez la souris (animal dépourvu de CETP), l'AN ne modifie pas la concentration de HDL-cholestérol. Cependant, des souris transgéniques exprimant la CETP humaine présentent une augmentation du HDL-cholestérol après traitement à l'AN (Hernandez et al., 2007). L'hypothèse avancée est que la diminution des TG des VLDL entraînerait une baisse des échanges via la CETP. De ce fait, les EC des HDL seraient moins échangés et la concentration en HDL-cholestérol augmenterait en conséquence. Les différentes études cinétiques disponibles apportent des informations contradictoires quand aux effets de l'AN sur le métabolisme de l'apoAI. Une première étude a rapporté un plus faible catabolisme des HDL après traitement (Blum et al., 1977) alors qu'une deuxième, menée chez des sujets sains, n'a montré aucun effet (Shepherd et al., 1979). Récemment, une hausse de la production d'apoAI a été observée chez des patients hypertriglycéridémiques alors que le catabolisme était inchangé (Lamon-Fava et al., 2008). L'ensemble des effets de l'AN sur les lipoprotéines sont résumés sur la figure 17.

III.2 Les acides gras polyinsaturés oméga 3

III.2.a Généralités : nomenclature, apports et métabolisme

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga 3 sont des acides gras insaturés dont la 1^{ère} double liaison est en position n-3. Ils dérivent de l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3) par une série de désaturations et d'élongations. Les deux principaux acides gras polyinsaturés à longue chaîne de cette famille sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3).

L'ALA est un acide gras indispensable car nécessaire à l'organisme mais non synthétisable par les mammifères. Les autres acides gras de la famille ω 3 sont dits essentiels car leur synthèse endogène n'est pas suffisante pour couvrir les besoins et ils nécessitent donc un apport alimentaire. En effet, 60% de l'ALA alimentaire est utilisé comme source d'énergie (Cunnane, 2001) et 30% comme source d'acétate pour la synthèse endogène d'acide gras (Brenna, 2002). Au final, seulement 0,2% de l'ALA serait transformé en EPA (Pawlosky et al., 2001), le reste ayant un rôle structural. Il a donc été nécessaire d'établir un apport nutritionnel conseillé (ANC) en ALA (1% de l'apport énergétique chez l'adulte) (Legrand, 2010). Concernant l'EPA et le DHA, les ANC ont été fixés à 250 mg/j chacun. Chez l'homme adulte, on ne connaît pas de situation de vraie carence nutritionnelle en acides gras ω 3 mais c'est leur importance en termes de prévention des MCV, du cancer ou de troubles psychologiques qui justifie actuellement de s'intéresser à leur consommation. Du fait d'un déséquilibre et d'une compétition entre AGPI ω 3 et AGPI ω 6, il est nécessaire de limiter l'apport en AGPI ω 6 mais surtout de favoriser la consommation d'AGPI ω 3. Pour cela, les huiles végétales riches en ALA (colza, soja et noix) peuvent être utiles tout comme la consommation de viande d'herbivores non ruminants (lapin, cheval) qui apportent de l'ALA issue de l'herbe sans qu'il y ait eu hydrogénation dans le rumen. En ce qui concerne les dérivés ω 3 à plus longue chaîne, le poisson (saumon, hareng, etc.) est sans aucun doute à favoriser pour augmenter les apports en EPA et DHA.

Depuis les trois dernières décennies, de nombreuses études épidémiologiques ont montré les bénéfices cardiovasculaires des AGPI ω 3 (Albert et al., 1998, Kromhout et al., 1985, Lee et al., 2008). Ces effets cardioprotecteurs ont été mis en évidence dès 1953 par Sinclair (1953) qui a décrit la rareté des incidents cardiovasculaires chez les esquimaux du Groenland. Depuis, de nombreuses études ont évalué les effets d'une supplémentation en AGPI ω 3 (Harris, 1997b),

validant sans équivoque le rôle protecteur des AGPI ω 3 vis-à-vis des MCV (Marchioli et al., 2002).

III.2.b Rôles physiologiques

III.2.b.i Au sein des membranes plasmiques

Les acides gras sont des composants essentiels des membranes biologiques. Lorsque le nombre d'insaturations au sein des acides gras augmente, la fluidité de la membrane s'accroît (Eldho et al., 2003) car les AGPI sont extrêmement flexibles et peuvent rapidement changer de conformation (Feller and Gawrisch, 2005). Du fait d'un nombre d'insaturation plus important, la flexibilité de la chaîne carbonée est plus grande pour les AGPI ω 3 que pour les AGPI ω 6 (Rajamoorthi et al., 2005). Il est donc normal que le rapport ω 3/ ω 6 au sein de la membrane influe fortement les propriétés physico-chimiques des membranes biologiques, influençant le trafic et la fonction des protéines ainsi que la formation et la fusion de différentes vésicules.

De nombreuses études se sont principalement intéressées au rôle spécifique du DHA. Il a tout d'abord été montré *in vivo* qu'un régime riche en DHA augmente la fluidité membranaire (Kamada et al., 1986) alors qu'inversement un régime dépourvu en DHA entraîne la formation de membranes plus rigides (Daveloose et al., 1993). Cependant, l'utilisation d'huile de poisson dans le régime des animaux ne semble pas généralement entraîner de modifications mesurables de la fluidité membranaire (Clamp et al., 1997, Gibney and Bolton-Smith, 1988, Popp-Snijders et al., 1986, Wahnon et al., 1992). Il existe également un lien entre perméabilité membranaire et AGPI, notamment DHA. En effet, la perméabilité de vésicules est augmentée de plus de 10 fois si elles sont riches en DHA (Hendriks et al., 1973). L'hypothèse avancée est un désordre accru de la double couche lipidique associé à une plus faible interaction entre les chaînes hydrophobes des PL. Enfin, les AGPI influencent les caractéristiques de fusion des membranes, le caractère élastique de celle-ci ainsi que la fréquence des phénomènes de « flip-flop » (Stillwell and Wassall, 2003).

Depuis un peu plus d'une décennie, des domaines membranaires spécifiques dénommés radeaux lipidiques ont été mis en évidence (Edidin, 1993, Simons and Ikonen, 1997). Il s'agit de microdomaines ordonnés, riches en cholestérol et sphingolipides, qui peuvent jouer un rôle dans certaines interactions membranes/protéines ou protéines/protéines. Le DHA entraîne une désorganisation partielle des radeaux lipidiques. En réalité, on a montré que la plus faible affinité

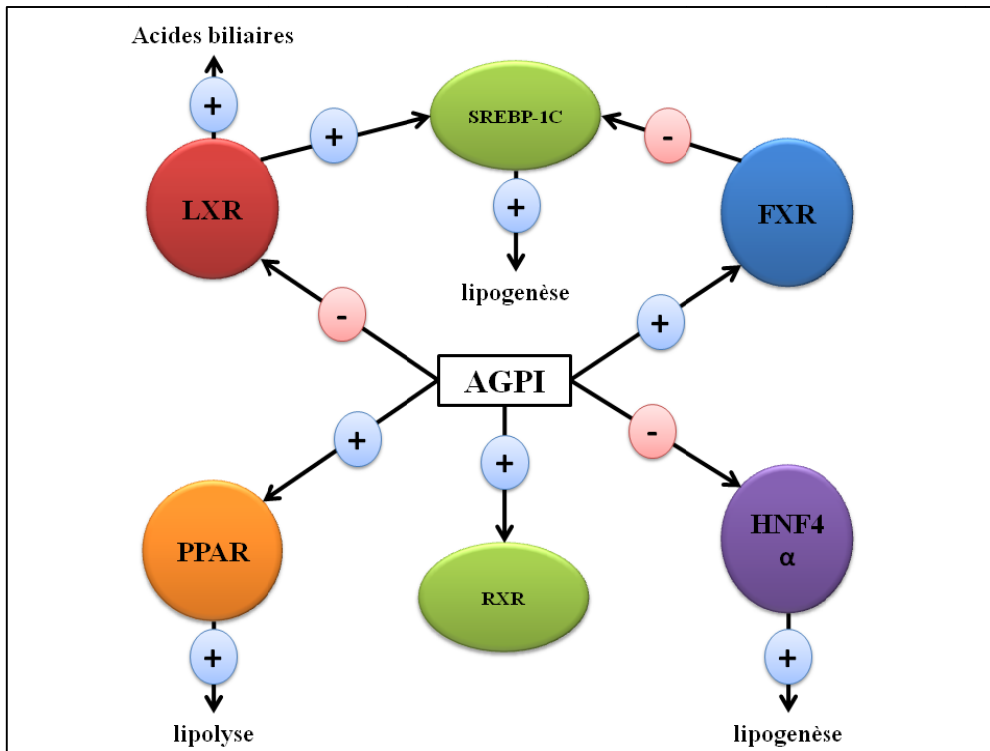


Figure 18 : Impact des acides gras polyinsaturés $\omega 3$ sur différents facteurs de transcription impliqués dans la lipolyse et la lipogénèse. FXR : *farnesoid X receptor*, HNF4 α : *hepatocyte nuclear factor 4 α* , LXR : *liver X receptor*, PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*, RXR : *retinoid X receptor*, SREBP-1c : *sterol regulatory element binding protein 1c*.

Tableau 9 : Effets des acides gras polyinsaturés $\omega 3$ sur les différents facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la lipogénèse.

Récepteur nucléaire	Effets sur la régulation de l'expression	Effets nets		
		Triglycérides	HDL	LDL
PPAR α	↑	↓↓	↑	↓
LXR	↓	↓↓	↓	↓
FXR	↑	↓↓	↑	↑
HNF4 α	↓	↓↓	↓	↔
Effets nets		↓↓↓↓	↔	↔

entre AGPI et cholestérol entraîne une séparation et la formation de deux zones distinctes : une riche en cholestérol et pauvre en AGPI et une autre riche en AGPI et pauvre en cholestérol (Brzustowicz et al., 2002, Mitchell and Litman, 1998, Shaikh et al., 2003). Les AGPI ω 3 sont capables de modifier la composition des lipides membranaires situés au niveau de ces radeaux lipidiques mais également d'influer sur les protéines qui y sont associées. L'EPA et le DHA sont connus pour leur propriété immunosuppressives (van der Heide et al., 1993). En effet, via la modification des radeaux lipidiques et des protéines associées, l'EPA et le DHA activent les lymphocytes T (Liang et al., 2001, Moffett et al., 2000). Ils favorisent l'apoptose et ont donc un impact potentiel sur le développement de certains cancers (Diaz et al., 2002). Dans la mesure où l'importance physiologique des radeaux lipidiques s'accroît au fil des études, la modification de leur composition par les AGPI, et donc de leur fonctionnalité, doit être plus largement étudiée.

Il est clair que la modification des caractéristiques physicochimiques des membranes par les AGPI peut influencer la fonctionnalité de différentes protéines. Ceci a été clairement montré avec le DHA sur deux protéines membranaires : la rhodopsine et la *protein kinase C* (PKC). Il a été mis en évidence que le changement de conformation de la rhodopsine nécessaire à l'initiation de la réponse neuronale à la lumière était favorisée par le DHA (Mitchell et al., 1992). La PKC est quant à elle activée par le DHA mais seulement lorsqu'il est incorporé dans des phosphatidyléthanolamine (Giorgione et al., 1995, Slater et al., 1994). Des études biophysiques ont montré que ces différences d'activité protéique pouvaient être provoquées par un changement de la courbure de la membrane (Giorgione et al., 1995). L'activité du récepteur à l'insuline peut également être modulée par les caractéristiques physicochimiques de la membrane plasmique. (McCallum and Epan, 1995). En effet, l'augmentation du degré d'insaturation des PL de la membrane est associée avec un accroissement du nombre de récepteurs à l'insuline mais également à une moindre affinité de liaison de l'hormone à son récepteur. (Ginsberg et al., 1982). A l'inverse, une plus grande saturation des PL membranaires conduit à une baisse du nombre de récepteur mais à une plus grande affinité de liaison entre l'insuline et le récepteur.

III.2.b.ii Régulation de l'expression génique

Les AGPI ω 3 sont connus pour être des modulateurs de l'expression de nombreux gènes. Ils agissent principalement sur 2 familles de récepteurs nucléaires (figure 18) : les PPARs et le SREBP-1c, et à un moindre niveau sur d'autres récepteurs tels que les RXR, les FXR, les LXR

ou le HNF4 α . Le tableau 9 résume les effets des AGPI ω 3 sur ces différents facteurs de transcription ainsi que les conséquences en termes de lipides plasmatiques.

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor : PPAR

Il existe 3 isoformes de PPAR identifiées (α , β/δ et γ) (Lemberger et al., 1996). L'activation du PPAR α , qui est principalement exprimé dans le foie, résulte en une prolifération peroxisomale et une oxydation lipidique qui se traduit par une baisse des TG plasmatiques. Les agonistes du PPAR α permettent également d'accroître le HDL-C et de diminuer l'athérosclérose. Le PPAR β est quant à lui ubiquitaire. De récentes études ont montré qu'il peut avoir un rôle hypolipémiant en augmentant l'oxydation des lipides dans le muscle squelettique (Karpe and Ehrenborg, 2009) et en favorisant le TICE (Vrins et al., 2009). Enfin, le PPAR γ existe sous 3 isoformes dont la plus étudiée, PPAR γ_2 , est principalement exprimée dans le tissu adipeux. Cette isoforme est impliquée dans l'adipogenèse et favorise la synthèse de petits adipocytes plus sensibles à l'insuline. De ce fait, les agonistes du PPAR γ entraînent une hausse de la sensibilité à l'insuline mais elle est associée à un gain de poids.

De nombreux acides gras mono- et polyinsaturés peuvent se lier au PPAR α à des concentrations physiologiques, entraînant une activation de sa transcription. En ce qui concerne les AGPI ω 3, l'EPA semble être un activateur plus puissant que le DHA (Pawar and Jump, 2003), bien que les dérivés de l'EPA semblent être les principaux ligands du PPAR α (Krey et al., 1997). En effet, des molécules telles que l'acide 8-hydroxyeicosatetraenoïque ou le leucotriène B4 sont des activateurs puissants du PPAR α . En ce qui concerne le PPAR γ , les AGPI semblent être de meilleurs activateurs que les autres acides gras. De plus, les dérivés des acides gras ω 6 sont des agonistes plus puissants sur le PPAR γ que ceux des AGPI ω 3 (Forman et al., 1995, Mater et al., 1998). Par exemple, la prostaglandine J2 est l'un des activateurs endogènes du PPAR γ le plus actif et le plus étudié (Forman et al., 1995). Enfin, le PPAR β est activé de manière similaire au PPAR α .

Sterol Regulatory Element Binding Protein : SREBP

Les AGPI ω 3 agissent principalement sur l'isoforme 1c du SREBP. Ce facteur nucléaire appartient à la famille des facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice. Il est exprimé dans la plupart des tissus avec cependant un niveau élevé dans les macrophages, le foie, le tissu

adipeux et le cerveau. Le SREBP-1c régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras comme la *fatty acid synthase* (FAS), la Δ 9 désaturase (Horton et al., 2002) mais aussi des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol tel que l'ABCG1 (Ecker et al., 2007).

L'activité et l'expression du SREBP-1c sont régulées par différents acides gras. Les AGPI ω 3 et ω 6 inhibent la transcription des gènes impliqués dans la lipogenèse en inhibant l'expression du SREBP-1c ou en limitant la maturation post-traductionnelle de la protéine. En effet, des régimes riches en acide linoléique, EPA ou DHA diminuent fortement l'expression du SREBP-1c (Xu et al., 1999). L'inhibition du SREBP-1c semble être due à une inhibition du LXR qui est son principal activateur. A l'inverse des AGPI, les acides gras saturés ou monoinsaturés n'ont pas d'effet sur le SREBP-1c.

Autres récepteurs nucléaires : LXR, RXR, FXR et HNF-4 α

LXR : liver X receptor

Les LXR α et β sont des facteurs de transcription couramment décrits comme des détecteurs de cholestérol (Repa and Mangelsdorf, 2000, Willy and Mangelsdorf, 1997). Il s'agit de régulateurs importants du métabolisme et du transport des acides gras et des stérols. Alors que le LXR β est ubiquitaire, le LXR α est présent dans le foie, le rein, les intestins et le tissu adipeux.

Les oxystérols sont des dérivés du cholestérol et les ligands naturels des LXRs. Les AGPI, et notamment l'acide arachidonique, semblent agir sur les LXRs en inhibant la liaison des oxystérols aux LXRs (Jump, 2002, Ou et al., 2001), entraînant en conséquence une diminution de l'expression du SREBP-1c.

RXR : Retinoid X receptor

Le RXR est impliqué dans la transduction de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque pour laquelle une dimérisation du RXR est nécessaire. Cependant, ce récepteur peut également agir en s'hétérodimérisant avec d'autres facteurs de transcription tel que les PPARs ou les LXRs. Certains AGPI, et notamment le DHA, sont des activateurs du RXR (de Urquiza et al., 2000).

FXR : Farnesoid X receptor

Le FXR est un récepteur nucléaire exprimé dans le foie et l'intestin et impliqué dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et lipidique (Forman et al., 1995). On a montré que les AGPI tel que l'acide arachidonique, l'acide linoléique ou le DHA étaient des ligands du FXR (Zhao et al., 2004a). Le principal rôle du FXR est de réguler la synthèse des acides biliaires, ainsi que leur transport. Le FXR régule également les phénomènes de détoxification (Claudel et al., 2005). Cependant, on a montré que le FXR joue également un rôle dans le contrôle du métabolisme lipidique, puisque des souris déficientes pour le FXR présentent une forte hypertriglycéridémie (Claudel et al., 2003, Sinal et al., 2000). Cette régulation de la triglycéridémie par le FXR semble être due à une activation de la LPL secondaire à une inhibition de la synthèse de l'apoCIII associée à une augmentation de celle de l'apoCII (Claudel et al., 2002, Kast et al., 2001). De manière plus surprenante, le FXR favorise l'expression du PPAR α , augmentant l'oxydation des lipides (Pineda Torra et al., 2003). Le FXR inhibe également l'expression du SREBP-1c, diminuant ainsi l'expression des enzymes de la lipogénèse. Enfin, le FXR est impliqué dans le métabolisme des HDL en réprimant la synthèse de l'apoAI (Claudel et al., 2002) mais également en augmentant l'expression de la PLTP (Urizar et al., 2000).

HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α

Le HNF4 α est un récepteur nucléaire exprimé dans le foie, l'intestin, les reins et le pancréas et considéré comme orphelin car son ou ses ligands naturels n'ont pas été clairement identifiés. Il est impliqué dans de nombreux aspects du métabolisme des lipides, des glucides et des protéines mais aussi dans l'hématopoïèse et la coagulation sanguine (Sladek, 1994). Hertz et al. (1998) ont montré que les acides gras se lient au récepteur sous forme d'acylCoA. Cependant, tous les acides gras ne sont pas capables d'activer ce récepteur (Hertz et al., 1998, Petrescu et al., 2002) : les acides gras saturés ont tendance à l'activer alors que les AGPI répriment son expression. De ce fait, les AGPI ω 3 affectent le métabolisme glucidique en réprimant l'activité de la L-pyruvate kinase et de la glucose 6 phosphatase (Pegorier et al., 2004), limitant la formation de TG à partir du pyruvate.

III.2.b.iii Rôle dans l'inflammation

Le lien entre AGPI et inflammation a été mis en évidence lors de l'étude de différentes maladies inflammatoires. En effet, les AGPI ω 3 semblent pouvoir jouer un rôle dans le traitement

de diverses maladies tel que la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme, le diabète, etc. (Calder, 2006). Les AGPI influencent les phénomènes inflammatoires de différentes manières : par la synthèse d'eicosanoïdes, en modulant l'expression de cytokines inflammatoires ou le stress oxydant.

Synthèse des eicosanoïdes

Les AGPI modulent l'inflammation en grande partie par l'intermédiaire de leurs dérivés eicosanoïdes (figure 19). Ceux-ci sont répartis en 3 classes principales : les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes.

Les cyclooxygénases et lipoxygénases convertissent l'acide arachidonique en prostaglandines (PG) et thromboxanes de la série 2 et en leucotriènes (LT) de la série 4. En ce qui concerne l'EPA, il conduit aux prostaglandines et thromboxanes de la série 3 et en leucotriènes de la série 5. La différence entre les eicosanoïdes issu des AGPI ω 3 ou des AGPI ω 6 est que la plupart de ceux provenant des AGPI ω 3 ont un caractère plutôt anti-inflammatoire alors que ceux dérivant de l'acide arachidonique sont plutôt pro-inflammatoires ou possèdent d'autres effets néfastes (Bagga et al., 2003, Robinson and Stone, 2006). Le tableau 10 résume les effets des eicosanoïdes les plus couramment décrits.

On a montré que l'apport d'acide gras dans l'alimentation peut influencer la synthèse des éicosanoïdes. En effet, une supplémentation en acide arachidonique (1,5 g/j pendant 7 semaines) entraîne une hausse de la production de PGE₂ et LTB₄ (Kelley et al., 1998). De même, une supplémentation en AGPI ω 3 dans le régime entraîne une augmentation de la proportion des ces AGPI dans les neutrophiles, cellules productrices d'eicosanoïdes (Gibney and Hunter, 1993, Healy et al., 2000). Par ailleurs, en utilisant de l'huile de poisson, Kelley et al. (1999) ont montré qu'une supplémentation de 6 g/j de DHA peut entraîner une baisse de la production de PGE₂ de 60% et de LTB₄ de 75% par les cellules mononucléaires stimulées par une endotoxine. Cependant, il faut noter qu'il existe une compétition pour les cyclooxygénases et lipoxygénases et que le rapport entre cytokines pro et anti-inflammatoires est dépendant du rapport ω 3/ ω 6.

L'EPA et le DHA peuvent aussi conduire à des molécules récemment identifiées : les résolvines. L'EPA conduit aux résolvines de la série E et le DHA à ceux de la série D. Les résolvines E exercent une action anti-inflammatoire et participent activement à la résolution de l'inflammation (Serhan et al., 2000a, Serhan et al., 2000b, Serhan et al., 2002). Le DHA permet

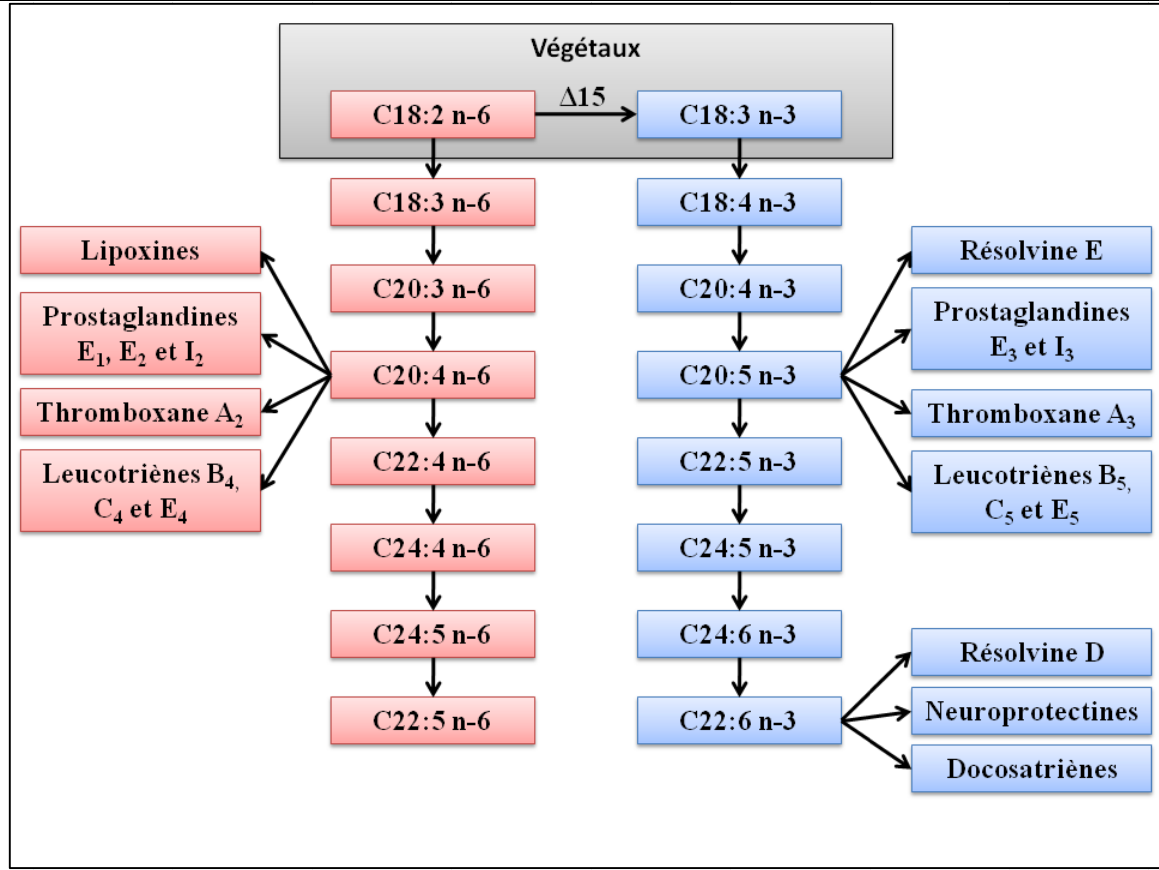


Figure 19 : Synthèse des dérivés eicosanoïdes à partir des acides gras polyinsaturés

Tableau 10 : Effets physiologiques des eicosanoïdes les plus courants.

	AGPI $\omega 6$		AGPI $\omega 3$	
	Dérivé	Effet physiologique	Dérivé	Effet physiologique
Prostaglandines	PGE ₂	Pro-arhytmique	PGE ₃	Anti-arhytmique
	PGI ₂	Pro-arhytmique	PGI ₃	Anti-arhytmique
Thromboxanes	TXA ₂	Activateur de l'agrégation plaquettaire	TXA ₃	Inhibiteur de l'agrégation plaquettaire
	TXB ₂	Vasoconstricteur	TXB ₃	Vasodilatateur
Leucotriènes	LTB ₄	Pro-inflammatoire	LTB ₅	Anti-inflammatoire
Résolvines				Anti-inflammatoire
Neuroprotectines				Anti-inflammatoire

la synthèse de résolvines D mais aussi d'autres médiateurs appelés docosatriènes et neuroprotectines qui apparaissent comme étant des molécules aux propriétés anti-inflammatoires (Hong et al., 2003, Marcheselli et al., 2003, Mukherjee et al., 2004). Ces molécules récemment découvertes ouvrent de nouvelles voies de recherches et les revues sur le sujet montrent des implications importantes en terme de santé (Serhan, 2005, Serhan et al., 2004).

Les cytokines pro-inflammatoires

Des études *in vitro* ont montré que l'EPA et le DHA peuvent inhiber la production d'IL1 β et de TNF α par les monocytes (Babcock et al., 2002, Lo et al., 1999, Zhao et al., 2004b) mais également la production d'IL6 et IL8 par les cellules endothéliales (De Caterina et al., 1994, Khalfoun et al., 1997). Ces observations ont été également réalisées *in vivo* sur des modèles animaux (Billiar et al., 1988, Renier et al., 1993, Yaqoob and Calder, 1995) mais aussi lors d'études cliniques menées chez l'homme (Caughey et al., 1996, Endres et al., 1989).

Les espèces réactives à l'oxygène

Les AGPI peuvent également influencer l'inflammation en limitant la production de ROS (*reactive oxygen species*) connues pour favoriser l'inflammation. En effet, une supplémentation de 3,1 g d'EPA et 8,4 g de DHA par jour entraîne une diminution de 30 à 55% de la production de ROS chez l'homme (Luostarinen and Saldeen, 1996, Varming et al., 1995). Une autre étude (Fisher et al., 1990) a montré que 6 g/j d'EPA et de DHA diminuent la production de peroxyde d'hydrogène par des monocytes humains. Cependant, des études utilisant des doses d'AGPI ω 3 plus physiologiques n'ont montré aucun effet sur la production de ROS (Kew et al., 2003, Miles et al., 2004). La relation exacte entre ROS et AGPI et l'implication de ceux-ci dans un mécanisme inflammatoire doit donc être confirmé.

III.2.c Acides gras polyinsaturés oméga 3 et syndrome métabolique

III.2.c.i Effets des acides gras ω 3 sur l'IR

Les AGPI ω 3 possèdent un fort pouvoir protecteur vis-à-vis de l'insulinorésistance et du syndrome métabolique. En effet, comme précédemment indiqué, les AGPI ω 3 limitent

l'inflammation qui est un des phénomènes initial de l'insulinorésistance. De plus, les effets bénéfiques des AGPI ω 3 sur les concentrations plasmatiques en lipides préviennent également la mise en place de la maladie. Les AGPI ω 3 sont donc bien un outil nutritionnel qui peut contribuer à prévenir l'insulinorésistance (Delarue et al., 2004, Lombardo and Chicco, 2006).

Cependant, lorsque l'insulinorésistance est d'ores et déjà installée, les effets des AGPI ω 3 sont moins connus. Il semblerait qu'ils puissent jouer un rôle thérapeutique chez les patients insulinorésistants. En effet, ils semblent favoriser la synthèse d'adiponectine, cytokine insulinosensibilisatrice (Flachs et al., 2006, Gonzalez-Periz et al., 2009, Perez-Matute et al., 2007). De plus, les AGPI ω 3 limitent le stockage des TG dans le muscle, facteur connu comme étant une des sources de l'insulinorésistance musculaire (Storlien et al., 1991). Gonzalez-Periz et al. (2009) ont montré que les AGPI ω 3 pouvaient réduire l'insulinorésistance et la stéatose hépatique chez la souris. Cependant, les doses AGPI ω 3 utilisées étaient assez importantes (6% des lipides totaux du régime). Un autre groupe (Lombardo et al., 1996, Lombardo et al., 2007) a également montré que des doses importantes d'AGPI ω 3 normalisent l'intolérance au glucose et améliorent l'action de l'insuline sans modification de l'insulinémie chez le rat.

Néanmoins, aucune étude menée chez des hommes insulinorésistants n'a montré un effet insulinosensibilisateur des AGPI ω 3. De plus, l'ensemble des études citées ont utilisé un modèle de rat génétiquement obèse ou rendu insulinorésistant par un régime riche en fructose. On peut alors se demander quels seraient les effets des AGPI ω 3 chez d'autres modèles animaux rendus obèses d'une manière plus conforme de ce qui se passe chez l'homme.

III.2.c.ii Effets des acides gras ω 3 sur la dyslipidémie

TG et lipoprotéines à apoB100

Les AGPI ω 3 sont bien connus comme agents hypotriglycéridémiants. Cette action est régulée via les différents facteurs de transcription décrits précédemment (figure 18). En effet, les AGPI activent l'oxydation lipidique via le PPAR α . De plus, ils inhibent la lipogenèse en inhibant le SREBP-1c. Comme vu précédemment, cette inhibition est indirecte et se réalise par 2 voies : d'une part une inhibition des LXRs par les AGPI ω 3 et d'autre part l'activation du FXR. Enfin, l'inhibition du HNF4 α par les AGPI ω 3 participe également au caractère hypotriglycéridémiant

des AGPI ω 3 (tableau 9). L'effet net est une forte réduction des TG plasmatiques qui a été évalué entre -25 et -30% (Harris, 1997b). De plus, l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3 peut également être contrôlé par une activation de l'expression de la LPL associée à une répression de celle de l'apoCIII, son principal inhibiteur physiologique. Cette baisse des TG est généralement associée chez l'homme à une modeste hausse de la concentration plasmatique en LDL-C (+5 à +10%) et aucun changement de celle en HDL-C.

En plus de l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3 qui limite la synthèse endogène de VLDL-TG, l'EPA et le DHA augmentent l'activité de la LPL (Khan et al., 2002, Park and Harris, 2003) et favorisent la lipolyse. De plus, une étude suggère que la peroxydation des AGPI ω 3 et le stress oxydant qui en résulte favoriseraient la dégradation hépatique de l'apoB100 et la baisse de la production hépatique de VLDL (Pan et al., 2004). Cependant, des études cinétiques sur le métabolisme de l'apoB100 ont montré que l'administration d'AGPI ω 3 entraîne une baisse des TG et des VLDL mais n'a a priori pas d'effet sur la lipolyse des VLDL et la production de LDL (Kasim-Karakas et al., 1995). Malgré cela, cette même étude a montré une hausse de la concentration plasmatique de LDL, probablement due, d'après les auteurs, à une diminution de leur catabolisme. Une 2^{ème} étude cinétique chez des patients diabétiques a montré une diminution de la synthèse des VLDL associée à une augmentation de la lipolyse entraînant une production accrue d'IDL (Ouguerram et al., 2006). Cette hausse de la lipolyse est plus cohérente avec l'augmentation de l'activité de la LPL.

Transport inverse du cholestérol

Bien que les AGPI ω 3 ne semblent pas affecter les concentrations plasmatiques de HDL (Harris, 1997b), certaines études ont montré qu'ils peuvent influencer le transport inverse du cholestérol. En effet, il est connu que les agonistes du PPAR α augmentent l'expression de l'ABCA1 des macrophages, favorisant ainsi l'efflux de cholestérol (Chinetti et al., 2001). Cet accroissement de l'efflux a par ailleurs été démontré *in vitro* (Dusserre et al., 1995, Pal and Davis, 1990). Cependant, une étude récente a infirmé ceci en montrant un effet négatif de l'EPA sur l'efflux de cholestérol dû à une limitation de la phosphorylation de l'ABCA1 nécessaire au bon fonctionnement du transporteur (Hu et al., 2009). *In vivo*, les résultats sont encore plus contradictoires. En effet, Gillotte et al. (1998) n'ont montré aucune amélioration de l'efflux avec les AGPI ω 3, mais Nishimoto et al. (2009) ont récemment montré que l'huile de poisson

favorisait l'efflux chez la souris. Dans cette étude, les auteurs ont montré une hausse de l'expression hépatique de l'ABCG5 et de l'ABCG8 alors que celle de l'ABCA1 n'était pas modifiée. Les effets des AGPI ω 3 sur l'expression et l'activité de l'ABCA1 et sur l'efflux de cholestérol ne sont donc pas clairement établis.

Les études cinétiques du renouvellement des apoAI et AII après traitement par des AGPI ω 3 ne sont pas très nombreuses. Une étude menée au laboratoire en 2001 (Frenais et al., 2001b) a montré que l'huile de poisson réduisait le catabolisme de l'apoAI et de l'apoAII des HDL, associé à une réduction de leur production, expliquant ainsi le maintien de leurs concentrations plasmatiques. Ces résultats ont été confirmés plus récemment (Chan et al., 2006). Il semblerait donc que les AGPI ω 3 ne favorisent pas le transport inverse du cholestérol. Cependant, une hausse de la sécrétion biliaire de cholestérol a été mise en évidence chez le rat (Morgado et al., 2005). De plus, chez la souris supplémentée en huile de poisson (Le Morvan et al., 2002), l'expression du SR-BI a été augmentée ainsi que la captation sélective des EC par le foie. Enfin, récemment, en utilisant des macrophages chargés en cholestérol radioactif et en mesurant la radioactivité du plasma, du foie, de la bile et des fèces, Nishimoto et al. (2009) ont montré chez la souris que l'huile de poisson favorise l'efflux de cholestérol de ces macrophages ainsi que l'efficacité du transport inverse du cholestérol. Ces résultats suggèrent donc un impact positif des AGPI ω 3 sur le transport inverse du cholestérol, mais au final, l'analyse de l'ensemble des études ne permet pas de conclure et de nouvelles investigations devraient être menées afin de déterminer plus précisément si les AGPI ω 3 favorisent ou non le transport inverse du cholestérol.

OBJECTIFS

Le risque cardiovasculaire associé à l'obésité peut être réduit efficacement par une perte de poids et une activité physique accrue. Cependant, un changement de comportement alimentaire et de mode de vie est difficilement réalisable dans nos sociétés occidentales. Des approches pharmaceutiques ou nutritionnelles apparaissent donc comme nécessaires afin de limiter le risque de développement de MCV.

Du fait du dramatique accroissement des MCV, le métabolisme du cholestérol a été largement étudié au cours des dernières décennies, et notamment le transport inverse du cholestérol, voie reconnue comme anti-athérogène. En effet, cette voie permet le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie en vue de son élimination dans les fèces sous forme de sels biliaires. Pendant longtemps, avant la mise en évidence du *trans-intestinal cholestérol excretion*, le transport inverse du cholestérol était d'ailleurs reconnu comme la seule voie d'élimination du cholestérol. De nombreuses études ont montré que la CETP jouait un rôle central dans ce transport car elle permet le transfert de cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL et LDL en échange de TG. Les conséquences de ce transfert sont un enrichissement des HDL en triglycérides, ce qui accélère leur catabolisme et réduit leur concentration plasmatique. En contrepartie, les VLDL et LDL s'enrichissent en esters de cholestérol, rendant ces particules plus athérogènes. De ce fait, cette protéine est reconnue comme pro-athérogénique et a été la cible d'essai thérapeutique visant à inhiber son action. Cependant, ces essais se sont conclus par un échec, notamment du fait de l'apparition d'une hypertension et d'une mortalité accrue. De plus, la dyslipidémie associée à l'insulinorésistance s'explique chez l'Homme par une activité accrue de la CETP, mais une dyslipidémie identique a été décrite chez le chien, espèce pourtant dépourvu de CETP. Il existe donc un paradoxe autour de cette protéine dont le rôle exact dans le métabolisme du cholestérol n'est pas totalement compris.

C'est pourquoi nous avons voulu étudier la relation entre TG et HDL-cholestérol chez le chien, espèce dépourvue de CETP. Ce modèle original permet donc de s'affranchir des transferts entre lipoprotéines, rendant la caractérisation de leur métabolisme plus accessible. De plus, le chien possède un transport inverse du cholestérol actif en comparaison de l'Homme, avec notamment une activité d'estérification du cholestérol et de capture sélective des esters de cholestérol particulièrement important. Le chien est donc un modèle de choix pour l'étude du transport inverse du cholestérol et de sa modulation.

Dans un 1^{er} temps, nous avons soumis des chiens à un régime gras afin d'induire une obésité, une insulino-résistance et une dyslipidémie, et en particulier une hypertriglycéridémie. Ce régime va nous permettre de mieux caractériser le modèle de chien obèse et insulino-résistant, en étudiant de manière dynamique la prise de poids et en cherchant à comprendre l'implication du tissu adipeux viscéral dans l'insulino-résistance. Nous avons ensuite étudié l'effet de deux agents hypotriglycéridémiants, l'acide nicotinique et les acides gras polyinsaturés oméga 3 sur le métabolisme du cholestérol. L'intérêt de ces études repose sur les effets différents sur le HDL-cholestérol de ces deux molécules. En effet, l'AN est décrit comme l'agent pharmaceutique le plus efficace pour augmenter le HDL-cholestérol alors que les acides gras polyinsaturés ω 3 sont apparemment sans effets en termes de concentration plasmatique. Grâce à une approche dynamique par le marquage des apolipoprotéines (apoAI et apoB100) et du cholestérol, méthode particulièrement performante pour obtenir des informations dynamiques sur le métabolisme des lipoprotéines, nous avons étudié les variations d'anabolisme et de catabolisme des lipoprotéines suite aux différents traitements. L'étude de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines nous a également permis de proposer certains mécanismes potentiellement impliqués.

TRAVAUX PERSONNELS

Partie 1

**Le chien obèse et insulino-résistant :
caractérisation et modulation de l'obésité et de l'insulino-résistance**

Article 1

Kinetics aspects of energy intake, body weight gain and insulin sensitivity in dogs given a high-fat high-energy diet.

Jérôme Le Bloc'h, Samuel Serisier, Muhammad-Quaid Zaman, Véronique Leray, Lucile Martin, Henri Dumon, Thierry Magot, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen.

En préparation.

Article 2

Differences in fatty acid composition and gene expression in the visceral and subcutaneous adipose tissues of nutritionally controlled dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen

Soumis à British Journal of Nutrition

Article 3

EPA and DHA supplementation improves insulin sensitivity and dyslipidemia in obese and insulin resistant dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Frédérique Durantou, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen

Soumis à Journal of Nutrition

I. Suivi cinétique de l'obésité chez des chiens soumis à un régime hyper-lipidique et hyper-énergétique

I.1 Introduction

Les modèles animaux du syndrome métabolique représentent un outil essentiel pour observer et comprendre les perturbations qui y sont associées, mais également pour essayer de les corriger. Le modèle canin présente de nombreux avantages, parmi lesquels son espérance de vie et sa taille, mais également son adaptabilité aux protocoles expérimentaux. Nous avons précédemment montré au laboratoire que l'obésité chez le chien était accompagnée de la survenue d'une résistance à l'insuline et d'une dyslipidémie (Bailhache et al., 2003a, Bailhache et al., 2003b). Cependant, les différentes études menées chez le chien se sont focalisées sur la comparaison entre état sain (statut normopondéral) et état obèse, sans s'intéresser à l'évolution de la prise de poids au cours du temps.

Dans cette étude, nous nous sommes attachés à étudier de manière dynamique la mise en place de l'obésité chez le chien soumis à un régime gras. Pour cela, 24 chiennes ont été soumises à un régime hyper-lipidique (42% de calories lipidiques). L'apport énergétique journalier des animaux correspondait à 2,2 fois leurs besoins selon les recommandations du NRC (*National Research Council*, 130 kcal d'énergie métabolisable/kg^{0,75}/jour) (NRC, 1985). La prise de poids hebdomadaire a été enregistrée durant le protocole ainsi que la prise alimentaire quotidienne. La sensibilité à l'insuline a été mesurée à l'état sain et à l'état obèse par la méthode de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinémique. Les objectifs en termes de prise de poids ont été doubles. Tout d'abord, une prise de poids de 25% a été réalisée afin d'étudier une 1^{ère} phase d'accroissement du poids corporel pouvant correspondre à l'initiation de l'obésité. Puis les chiens ont été nourris avec le même régime jusqu'à obtention d'un poids obèse stable sur une période de 8 semaines minimum. Nous avons ainsi recherché une stabilisation de l'obésité, indiquant le retour à une balance énergétique proche de l'équilibre.

I.2 Article 1

Kinetics aspects of energy intake, body weight gain and insulin sensitivity in dogs given a high-fat high-energy diet.

Jérôme Le Bloc'h, Samuel Serisier, Muhammad-Quaid Zaman, Véronique Leray, Lucile Martin, Henri Dumon, Thierry Magot, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen.

En préparation.

Kinetics aspects of energy intake, body weight gain and insulin sensitivity in dogs given a high-fat high-energy diet.

J. Le Bloc'h^{1,2}, S. Seriser¹, M.Q. Zaman¹, V. Leray¹, L. Martin¹, H. Dumon¹, T. Magot², K. Ouguerram² and P. Nguyen¹.

Human nutrition research center, Nantes, France

1. Nutrition and endocrinology unit, National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, ONIRIS, Nantes, France.

2. INSERM U915, University hospital, Nantes, France.

Running head: high-fat diet in dogs.

Keywords: obese dogs, high-fat diet, insulin resistance.

Corresponding Author:

Prof. Patrick Nguyen

Unité de Nutrition et Endocrinologie

Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique

Site de la chantrerie

Boite postale 40706, 44307 Nantes Cedex 3, France

patrick.nguyen@oniris-nantes.fr

Tel: 33 (0)2 40 68 76 35

Fax: 33 (0)2 40 68 77 46

Summary

Canine obesity is a common disease in Western countries. Previous studies in dogs have mainly compared lean and obese states, but the weight gain has never been studied with a kinetic perspective. The aim of this study was to examine the range of effects of excess energy intake on body weight (BW) gain and kinetics, daily energy intake, and insulin sensitivity. 24 beagle dogs (9.34 ± 1.24 kg) were fed with a high-fat high-energy diet (4300 kcal/kg, 2.2 times the NRC recommendations for adult maintenance). Weight gain was measured weekly, and energy intake was recorded daily. Insulin sensitivity has been assessed by the euglycemic hyperinsulinemic clamp method at the beginning of the high-fat diet and after obese body weight stabilization. Dogs gained 25% of BW gain in 8.3 ± 2.2 weeks, and they stabilized their obese BW (14.99 ± 3.13 kg, +61% BW increases) after 34 ± 15 weeks. Obesity was associated with an insulin resistance. Energy intake has been reduced from 285 ± 30 kcal/kg^{0.75}/d to 164 ± 48 kcal/kg^{0.75}/d (range 83 to 301 kcal/kg^{0.75}/d). The main result of our study is probably the huge variation in the diet efficiency among dogs, for weight gain as well as for obese animal maintenance requirements. These variations would be probably similar for weight loss, and we need consequently to adapt dietary restriction to each animal in order to improve the success of weight management.

Introduction

As in human, dog's obesity has been increasing over the last decades. According to various studies, the prevalence of obesity in adult dogs is varying between 24 to 44% in western countries (Edney and Smith, 1986, Hand et al., 1989, Mason, 1970). The consequences of obesity must not be underestimated. Obesity is associated with number of diseases like locomotors and musculoskeletal problems (Kealy et al., 2002), respiratory distress, hypertension or cardiac diseases (Kuruvilla and Frankel, 2003). Finally, obesity clearly reduces lifespan and increases morbidity (Kealy et al., 2002).

It is recognized that obesity in dogs results primarily from excessive intake of food energy and reduced physical activity (Bland et al., 2009, Burkholder and Bauer, 1998). Other factors for increased prevalence have been identified as decreased metabolic rate, insufficient feed nutrients, gender, advancing age, breed and de-sexing (Edney and Smith, 1986, Fettman et al., 1997). However, given the control owners have over the management of dogs, it is not surprising that human socioeconomic and lifestyle factors play a major role in the emerging obesity problem (Burkholder and Bauer, 1998).

As obesity is increasing in western countries, dog's weight management is more and more present in veterinary practice (Bland et al., 2010). In this aim, the new medication recently developed (SlentrolTM, Pfizer Animal Health) (Gossellin et al., 2007, Wren et al., 2007) could be helpful. However, it would be preferable to favor a more traditional approach, consisting to reduce calories intake and increase exercise. This nutritional-based weight loss programs are often unsuccessful, variable among dogs and dependent upon owner compliance (Laflamme et al., 1997). In fact, the difficulties are to determine energy expenditure of obese dogs and to predict dog adaptation to food restriction.

In order to determine more effective dietary weight reduction programs and to increase the success of weight management in dogs, we need to have better understanding of the setting up of obesity. We also need to determine more precisely the energy requirement of obese dogs and to predict their food restriction adaptation. The aim of this study was to examine the range of effects of excess energy intake on body weight (BW) gain kinetics, energy intake and also on insulin sensitivity in beagle dogs given a high-fat high-energy diet.

Materials and methods

Animal and diet

Twenty-four healthy female beagle dogs, neutered one month before the beginning of the high-fat high energy diet, were included in this study (age 1.4 ± 0.2 years). In order to induce obesity, all dogs were overfed [approximately 2.2 times the National Research Council (NRC) recommendation for adult maintenance] with a high-fat, dry (extruded) commercial diet (Medium junior; Royal Canin, Aimargues, France) (Table 1). All dogs received their allocated rations in a single meal each day and water was constantly available. Food intakes were recorded daily. All animals were housed at the National Veterinary School of Nantes, France, according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of agriculture and Fisheries. The experimental protocol was adhered to European Union guidelines and was approved by the local Animal Use and Care Advisory Committee.

Study design

The “normal state” was defined as that observed prior the study start (i.e. baseline, before overfeeding). Dogs initial BW was called BW_0 . The first step of this study was to bring dogs to

25% of weight excess (dogs BW was called BW₂₅). The final BW (BW_S) was determined as a stabilized BW for at least 8 weeks.

Euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp

A 3-h euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp was conducted in 24-h fasted dogs to determine in vivo insulin sensitivity, as previously described (Bailhache et al., 2003b). Insulin sensitivity was measured in the normal state (i.e. at BW₀) and after 8 weeks of stabilized BW (i.e. at BW_S). Briefly, human insulin (Actrapid; NovoNordisk, Bagsvaerd, Denmark) was infused (via a catheter placed in a cephalic vein) to induce hyperinsulinaemia (4 mU/kg for 1 min and 2 mU/kg/min for the duration of the experiment). Glucose (Glucose 20%; Laboratoire Aguettant, Lyon, France) was clamped at basal levels by adjustment of the glucose infusion rate in the cephalic vein. Blood samples were drawn from a jugular catheter every 5 min from 0 to 60 min and every 10 min from 60 to 180 min. These samples were placed in ice-cold heparinized tubes and centrifuged at 4°C, 2724 g for 10 min and stored at -80°C for further insulin analysis. Insulin sensitivity index (I_{IS}) was defined as the mean glucose infusion rate (mg/kg/min) divided by the mean plasma insulin concentration (μU/mL) of the last 60 min of the clamp (Radziuk, 2000). Rapid determination of blood glucose during clamping was achieved using the glucose oxidase method (Glucotrend® Plus; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma insulin concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay kit (RIA Insik-5; Diasorin, Saluggia, Italy).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses using Stat View 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) were performed with student's test for paired values. A p-value < 0.05 was considered to be significant.

Results

Body weight evolution

The BW evolution is shown on fig. 1. The initial BW (BW_0) was about 9.34 ± 1.24 kg. Dogs reached rapidly the first goal of 25% weight excess (BW_{25}) in 8.3 ± 2.2 weeks. The BW stabilization needed 34 ± 15.5 weeks (from 14 to 62 weeks). BW_S was about 14.99 ± 3.13 kg. The average BW increase between BW_0 and BW_S was about $+61.2 \pm 31.4$ % ($p < 0.001$), with a huge variation (+30 to +145 % of BW increase). There is no relationship between the BW increase and the time needed for BW stabilization ($R^2 = 0.389$) (Fig. 2).

The rate of weight gain between BW_0 and BW_{25} was about $+2.92 \pm 0.79$ %/wk (from +1.88 to +4.56 %/wk), and about $+1.29 \pm 0.68$ %/wk between BW_{25} and BW_S (from +0.84 to +2.35 %/wk).

Energy intakes

The initial energy intakes, expressed in kcal per metabolic body weight kilos per day, was 285 ± 30 kcal/kg^{0.75}/d. At the end of the study, energy intakes were 164 ± 48 kcal/kg^{0.75}/d (based on BW_S), or about 239 ± 69 kcal/kg^{0.75}/d if expressed on BW_0 . The range of obese dogs intakes was from 83 to 301 kcal/kg^{0.75}/d.

Insulin sensitivity

I_{IS} was significantly lower in obese dogs than in the normal state (0.121 ± 0.034 vs. 0.195 ± 0.082). Insulin sensitivity index has been reduced by $-26 \pm 40\%$ ($p < 0.001$) after BW stabilization.

Discussion

Dog obesity has already been studied but the physiological relevance of the diet commonly used to induce this obesity can be questioned. In some studies, adult dogs were fed with a very high-fat diet (8100 kcal/day, equivalent to 11 times the NRC recommendations for adult dog maintenance), that included up to 80% fat calories and essentially no more than 3% protein calories (Rocchini et al., 1997). A more un-physiological diet (94% fat calories, 13 times NRC recommendations) has been used to induce a 45% weight gain in 13 weeks (Villa et al., 1998). These diets should have exacerbated all the disturbances associated with obesity, and consequently such studies could not be used as clinical reference. Other studies (Kaiyala et al., 2000) used more physiological diet in term of calories intake (4300 kcal/day, 2.2 times the NRC recommendations) but with 80% of these calories from fat. One more time, the physiological relevance of such diet is not obvious. In our study, we induced obesity with a moderate energy intake (2.2 times the NRC recommendations) with 42% of calories from fat, 30% from protein and 28% from carbohydrates. We showed that this diet leads to a 61% weight gain in 34 weeks. The obesity developed would be closer to the pathology observed in daily veterinary practice. Sensitivity to insulin, usually defined in relation to insulin action on glucose metabolism, was assessed using the gold reference method, the euglycemic hyperinsulinemic clamp (Radziuk, 2000). It's well known that obesity decreased insulin sensitivity (DeFronzo and Ferrannini, 1991) and weight loss results in an improvement in insulin sensitivity (Olefsky et al., 1974, Tiikkainen et al., 2004). In our study, we observed a decrease in I_{IS} , and thus we confirmed the association

between obesity and insulin resistance. Kabir et al. (2005) have proposed that the reduction in insulin sensitivity in fat-fed dogs could be explained by a decrease in liver insulin receptor binding. Moreover, free fatty acid can interfere directly with insulin binding (Svedberg et al., 1990), and several studies have shown an increase in plasma free fatty acid concentration in obese dogs (Kabir et al., 2005, Bailhache et al., 2003a). Interestingly, basal insulin and glucose concentrations did not change in the current study. Our obese dogs were insulin resistant but not diabetic, as previously shown (Bailhache et al., 2003a, Serisier et al., 2008).

Interestingly, we showed a disparity in the decrease in I_{IS} among animals ($-26 \pm 40\%$) without any relationship between weight gain and decrease in I_{IS} . Previously, our laboratory has shown that obesity in dog leads to a dramatically decrease (-44 to -60%) in I_{IS} (Bailhache et al., 2003b, Serisier et al., 2008). Our dogs did not present a so elevated insulin resistance despite a similar diet. The disparity in the response to diet could be an explanation of the moderate insulin resistance. Surprisingly, a few dogs did not present any insulin resistance despite a significant BW increase. These differences could be at least partly explained by genetic differences among dog. Some animals could be more resistant to the disturbances due to the high-fat high-energy diet.

Human obesity has been described in 3 phases (WHO, 2004). The first one is the pre-obese state static phase, when the individual energy balance and weight are constant. The second one is the dynamic phase, during which the individual gains weight as a result of energy intake exceeding energy expenditure over a prolonged period. And, finally, the third phase has been called the obese static phase, and correspond to the time when energy balance is regained but weight is now higher than during the pre-obese state.

We showed in this study that dogs gained weight from the beginning of the study, as soon as energy intakes have been increased. We also showed that this dynamic phase could be divided in

two steps. Firstly, a rapid BW increase, and in a second step, the average of increase was twice less important. Interestingly, we showed huge variations of weekly and total BW increase among dogs. It must be the most important lesson from this study: the considerable variation of dog susceptibility to develop obesity, and also of the diet energy efficiency among dogs for weight gain as well as for obese animal maintenance requirements. We can presume that these variations would be similar for weight loss. The disparity could partly explain the lack of success of dogs' weight management (Laflamme et al., 1997). To increase the success of weight loss programs, veterinarian need to adapt dietary restriction to each dogs.

In conclusion, we showed that the set up of obesity in dogs can be divided in two phases: firstly, a rapid weight gain, and secondly, a more slowly BW increase. We also showed that there are considerable variations of the diet energy efficiency among dogs for weight gain as well as for obese animal maintenance requirements. These variations should be similar for weight loss. In the aim of increasing the success of weight management, we need to adapt dietary restriction to each animal.

- Bailhache, E.; Nguyen, P.; Krempf, M.; Siliart, B.; Magot, T.; Ouguerram, K., 2003a: Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism*, **52**, 559-564.
- Bailhache, E.; Ouguerram, K.; Gayet, C.; Krempf, M.; Siliart, B.; Magot, T.; Nguyen, P., 2003b: 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**, 86-95.
- Bland, I. M.; Guthrie-Jones, A.; Taylor, R. D.; Hill, J., 2009: Dog obesity: owner attitudes and behaviour. *Prev Vet Med*, **92**, 333-340.
- Bland, I. M.; Guthrie-Jones, A.; Taylor, R. D.; Hill, J., 2010: Dog obesity: veterinary practices' and owners' opinions on cause and management. *Prev Vet Med*, **94**, 310-315.
- Burkholder, W. J.; Bauer, J. E., 1998: Foods and techniques for managing obesity in companion animals. *J Am Vet Med Assoc*, **212**, 658-662.
- DeFronzo, R. A.; Ferrannini, E., 1991: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, **14**, 173-194.
- Edney, A. T.; Smith, P. M., 1986: Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet Rec*, **118**, 391-396.
- Fettman, M. J.; Stanton, C. A.; Banks, L. L.; Hamar, D. W.; Johnson, D. E.; Hegstad, R. L.; Johnston, S., 1997: Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats. *Res Vet Sci*, **62**, 131-136.
- Gossellin, J.; McKelvie, J.; Sherington, J.; Wren, J. A.; Eagleson, J. S.; Rowan, T. G.; Sunderland, S. J., 2007: An evaluation of dirlotapide to reduce body weight of client-

- owned dogs in two placebo-controlled clinical studies in Europe. *J Vet Pharmacol Ther*, **30 Suppl 1**, 73-80.
- Hand, M. S.; Armstrong, P. J.; Allen, T. A., 1989: Obesity: occurrence, treatment, and prevention. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **19**, 447-474.
- Kabir, M.; Catalano, K. J.; Ananthnarayan, S.; Kim, S. P.; Van Citters, G. W.; Dea, M. K.; Bergman, R. N., 2005: Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **288**, E454-461.
- Kaiyala, K. J.; Prigeon, R. L.; Kahn, S. E.; Woods, S. C.; Schwartz, M. W., 2000: Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes*, **49**, 1525-1533.
- Kealy, R. D.; Lawler, D. F.; Ballam, J. M.; Mantz, S. L.; Biery, D. N.; Greeley, E. H.; Lust, G.; Segre, M.; Smith, G. K.; Stowe, H. D., 2002: Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **220**, 1315-1320.
- Kuruvilla, A.; Frankel, T. L., 2003: Heart rate of pet dogs: effects of overweight and exercise. *Asia Pac J Clin Nutr*, **12 Suppl**, S51.
- Laflamme, D. P.; Kuhlman, G.; Lawler, D. F., 1997: Evaluation of weight loss protocols for dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, **33**, 253-259.
- Mason, E., 1970: Obesity in pet dogs. *Vet Rec*, **86**, 612-616.
- Olefsky, J.; Reaven, G. M.; Farquhar, J. W., 1974: Effects of weight reduction on obesity. Studies of lipid and carbohydrate metabolism in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J Clin Invest*, **53**, 64-76.
- Radziuk, J., 2000: Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4426-4433.

- Rocchini, A. P.; Marker, P.; Cervenka, T., 1997: Time course of insulin resistance associated with feeding dogs a high-fat diet. *Am J Physiol*, **272**, E147-154.
- Serisier, S.; Gayet, C.; Leray, V.; Le Bloc'h, J.; Ouguerram, K.; Magot, T.; Nguyen, P., 2008: Hypertriglyceridaemic insulin-resistant obese dog model: effects of high-fat diet depending on age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **92**, 419-425.
- Svedberg, J.; Bjorntorp, P.; Smith, U.; Lonroth, P., 1990: Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes*, **39**, 570-574.
- Tiikkainen, M.; Bergholm, R.; Rissanen, A.; Aro, A.; Salminen, I.; Tamminen, M.; Teramo, K.; Yki-Jarvinen, H., 2004: Effects of equal weight loss with orlistat and placebo on body fat and serum fatty acid composition and insulin resistance in obese women. *Am J Clin Nutr*, **79**, 22-30.
- Villa, E.; Rabano, A.; Albarran, O. G.; Ruilope, L. M.; Garcia-Robles, R., 1998: Effects of chronic combined treatment with captopril and pravastatin on the progression of insulin resistance and cardiovascular alterations in an experimental model of obesity in dogs. *Am J Hypertens*, **11**, 844-851.
- WHO, 2004: Obesity : preventing and managing the global epidemic. *Report of a WHO consultation, Geneva, World Health Organization*.
- Wren, J. A.; Ramudo, A. A.; Campbell, S. L.; King, V. L.; Eagleson, J. S.; Gossellin, J.; Sunderland, S. J., 2007: Efficacy and safety of dirloptapide in the management of obese dogs evaluated in two placebo-controlled, masked clinical studies in North America. *J Vet Pharmacol Ther*, **30 Suppl 1**, 81-89.

Figure legends

Figure 1: Body weight evolution of the 24 dogs given a high-fat high-energy diet during the 40 weeks of the study. Data are presented as mean \pm SEM.

Figure 2: Regression analyze of the association of the percent increase of BW with the time needed for BW stabilization for the 24 dogs.

Table 1: Nutrient profile of the commercially high-fat diet used to induce obesity.

High-fat diet contained rice, poultry meal, animal fat, beet pulp, poultry protein isolate, minerals, plant fibers, yeasts, vegetable oil, fish oil, trace elements, vitamins, egg powder.

† Analysed values provided by the manufacturer

Nutrients	†
Protein (g/100g)	32
Fat (g/100g)	20
Starch (g/100g)	25.5
Total dietary fiber (g/100g)	11.1
Minerals (g/100g)	4.3
Metabolizable energy (kcal/g)	4.3

Figure 1:

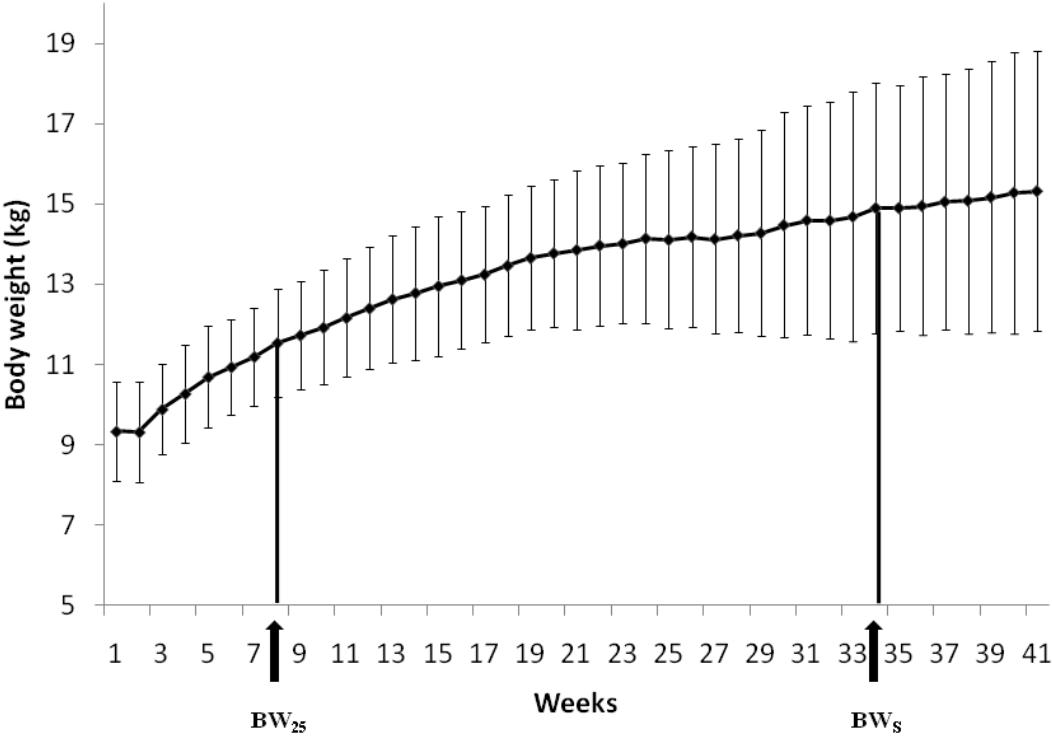
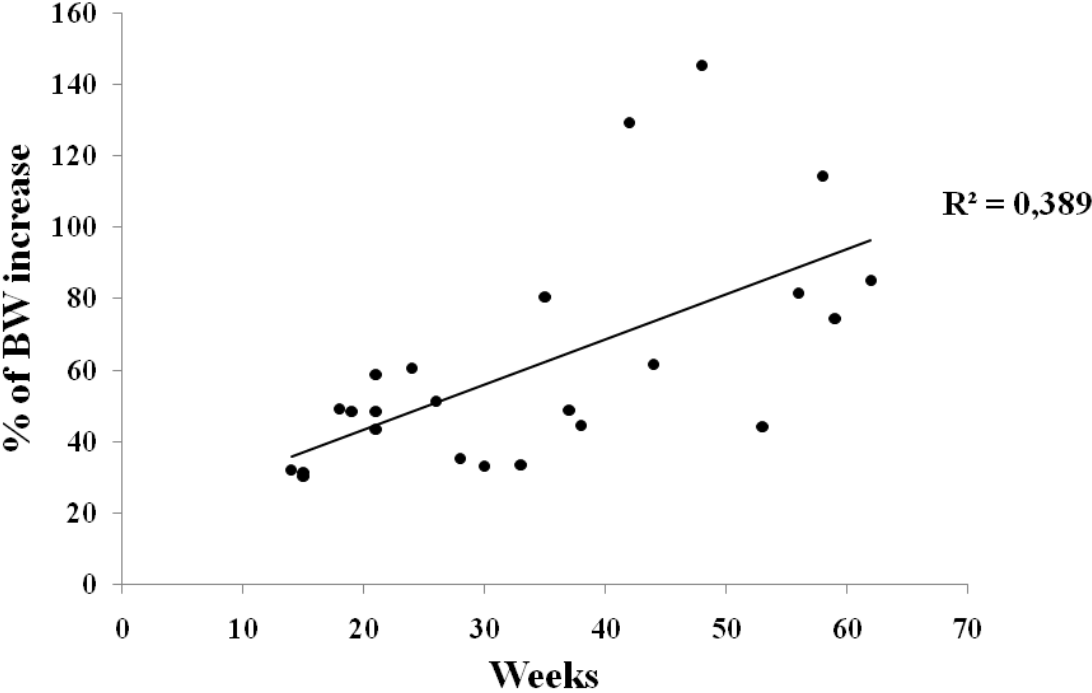


Figure 2:



I.3 Discussion

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre la dépense énergétique et la prise alimentaire, avec l'apport calorique excédant les besoins réels. Cette situation est d'autant plus représentative de nos sociétés occidentales que celles-ci conduisent à une situation de pléthore alimentaire et à une sédentarisation, conduisant à un déséquilibre de plus en plus important. Afin de pouvoir proposer de meilleures prises en charge de la perte de poids, il est important de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'obésité. Dans notre étude, nous montrons qu'un régime hyper-lipidique et hyper-énergétique conduit, chez le chien, à une prise de poids moyenne de $61 \pm 31\%$ en 35 ± 15 semaines. De plus, comme observé dans les études préalablement réalisées au laboratoire (Gayet et al., 2004a, Serisier et al., 2008, Bailhache et al., 2003b), l'obésité s'accompagne d'une diminution de la sensibilité à l'insuline. Néanmoins, la glycémie et l'insulinémie à jeun des animaux ne sont pas modifiées par le régime, indiquant que les chiens obèses sont insulino-résistants mais pas diabétiques.

L'obésité canine a bien entendu déjà été étudiée. Cependant, la pertinence physiologique des régimes utilisés pour induire la prise de poids peut être questionnée. Par exemple, Rocchini et al. (1997) ont utilisé un régime très riche en gras (80% des calories sous forme lipidique) et très énergétique (8100 kcal/j, soit 11 fois les recommandations du NRC). D'autres régimes encore moins physiologiques ont également été utilisés (94% de calories lipidiques, 13 fois les recommandations du NRC) (Villa et al., 1998). De tels régimes ont bien sûr pu avoir pour effets d'exacerber l'ensemble des perturbations associées à l'obésité. Par conséquent, des régimes « plus physiologiques » en termes de consommation calorique ont été utilisés, mais une nouvelle fois, la part importante des lipides dans ces régimes (80% des calories) peut limiter les conclusions obtenues (Kaiyala et al., 2000). En partant de ce constat, le régime que nous avons utilisé est plus modéré, aussi bien en termes de calories totales qu'en ce qui concerne la part des lipides dans l'apport énergétique. Par conséquent, nos observations se rapprochent plus de la réalité de la situation de l'obésité canine rencontrée quotidiennement en clinique vétérinaire et peuvent mimer l'installation de l'obésité chez l'homme.

Il faut noter néanmoins que le niveau de suralimentation (2,2 fois les besoins) reste élevé. En effet, cet apport énergétique correspondrait à environ 4500-4800 kcal/jour pour un homme de corpulence normale, ce qui reste possible mais correspond à une réalité extrême. Bien que moins

extrême que les niveaux précédemment utilisés chez le chien, l'apport calorique de cette étude peut donc être critiquable. Cependant, une précédente étude menée au laboratoire a induit une obésité chez des chiens en utilisant un niveau de suralimentation plus modéré, plus proche de la situation humaine (1,4 fois les besoins d'entretien, 55% de calories lipidiques) (Gayet et al., 2003). Bien que le niveau d'obésité obtenu fût comparable aux autres études (environ 44% de prise de poids), il a fallu en moyenne 78 semaines pour atteindre un poids obèse stable. Cette durée étant assez longue dans le cadre d'une thèse, il a donc fallu choisir un apport énergétique qui permette de faire un compromis entre la durée de l'étude et la pertinence du régime.

La proportion de lipide dans le régime était également un point critique dans la mise au point de l'étude. L'aliment utilisé était composé de 20% de matières grasses, ce qui correspond à 42% de l'apport calorique. Cette proportion est sensiblement la même que celle observée lors d'études épidémiologiques chez l'homme. En effet, en 2005, l'analyse des habitudes alimentaires des patients de la cohorte SU.VI.MAX a montré que, pour des hommes en surpoids, la part des lipides dans l'apport calorique représentait 37% (Czernichow et al., 2005). Plus récemment, ce niveau a été confirmé à environ 39% (Lafay and Verger, 2010). Ces études prenaient en compte l'apport d'alcool dans le régime (entre 6 et 8 % de l'apport énergétique). Le niveau de lipide dans notre étude est donc très similaire à celui mesuré dans les habitudes de la population.

La cinétique du gain de poids peut être divisée en deux phases. Lors d'une 1^{ère} phase, la prise de poids est rapide ($+2,9 \pm 0,8\%$ par semaine), puis, par la suite, celle-ci est plus limitée ($+1,3 \pm 0,7\%$ par semaine). L'organisation mondiale de la santé a décrit l'obésité humaine selon 3 phases (WHO, 2004) : une phase pré-obèse statique durant laquelle la balance énergétique est stable de même que le poids, une phase dynamique pendant laquelle une prise de poids a lieu, et enfin une phase obèse statique lorsque la balance énergétique est à nouveau stable mais à un poids obèse stable. Notre étude met en évidence un gain de poids dès le début du régime hyper-énergétique. Nous montrons également que la phase dynamique peut elle-même se diviser en 2 parties en fonction de l'importance de la prise de poids. L'augmentation directe et rapide du poids montre qu'il n'existe pas chez le chien de phase d'adaptation du métabolisme. En effet, il aurait été possible que l'animal augmente sa dépense énergétique ou diminue sa prise alimentaire afin de limiter la prise de poids.

Un des enseignements de cette étude est probablement la très large variabilité interindividuelle. En effet, nous montrons que la prise de poids varie de +30 à +145% chez des

chiens de même poids et de même âge soumis au même régime. La prise de poids hebdomadaire est également très variable, ainsi que la consommation alimentaire. De la même manière, le temps nécessaire à la stabilisation du poids obèse varie de 14 à 62 semaines. Il est intéressant de noter qu'aucune corrélation n'existe entre la prise de poids et la durée nécessaire à la stabilisation de celui-ci. Il existe donc une considérable variation dans la susceptibilité des chiens à développer l'obésité, mais également dans l'efficacité énergétique du régime à favoriser la prise de poids et à couvrir les besoins énergétique de maintien de l'animal obèse. On peut supposer que cette variabilité puisse également exister lors d'une perte de poids. En effet, on a montré que les régimes hypoénergétiques se concluaient souvent par un échec dans la perte de poids des chiens (Laflamme *et al.*, 1997). La variabilité interindividuelle peut en partie expliquer ce type de résultats. Il est donc nécessaire à l'avenir d'adapter le régime spécifiquement à chaque animal en fonction de la réponse observée lors de la perte de poids afin de garantir une efficacité maximale des régimes.

II. Variations métaboliques entre le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané

II.1 Introduction

Le tissu adipeux joue un rôle central dans les perturbations métaboliques associées à l'obésité. Cependant, le tissu adipeux viscéral a été décrit comme étant plus néfaste que le tissu adipeux sous-cutané (Lafontan and Girard, 2008). La théorie portale propose que, en raison d'une lipolyse intra-adipocytaire accrue en situation d'obésité et d'insulinorésistance, le tissu adipeux relargue plus d'acides gras non estérifiés (AGNE) dans la circulation (Ruan and Lodish, 2003). Du fait de sa situation anatomique, le tissu adipeux viscéral libérerait alors directement les AGNE dans la veine porte, qui agiraient sur le foie et entraîneraient diverses perturbations telles qu'une insulinorésistance et une stéatose hépatique. Les différences métaboliques entre les 2 tissus adipeux ont fait l'objet de quelques études soutenant cette hypothèse (Kabir et al., 2005, Mittelman et al., 2002). Ces auteurs ont décrit une plus grande insulinorésistance du tissu adipeux viscéral ainsi qu'une lipolyse accélérée du fait d'une activité accrue de la lipase hormono-sensible. De plus, il a été mis en évidence une accumulation intra-hépatique de triglycérides ainsi qu'une réduction de 50% de la liaison de l'insuline à son récepteur au niveau du foie, reflétant une diminution de la sensibilité à l'insuline hépatique.

Néanmoins, ces études ne se sont pas intéressées à la composition en acides gras des deux tissus adipeux qui, en ce qui concerne le tissu adipeux viscéral, pourrait refléter, du moins en partie, celle du flux d'AGNE vers le foie. Les quelques études menées sur la composition en acides gras des tissus adipeux viscéral et sous-cutané chez l'homme doivent être analysées avec précautions du fait de différences dans la prise alimentaire et les habitudes nutritionnelles de la population étudiée (Karlsson et al., 2006, Pezeshkian et al., 2009). Les études menées sur différents modèles animaux ont bien entendu été mieux contrôlées au niveau des apports alimentaires, notamment en ce qui concerne les acides gras (Perona and Ruiz-Gutierrez, 2004, Radcliffe et al., 2004), mais dans le cadre de notre étude, le modèle animal utilisé se doit d'être adapté à l'étude de l'insulinorésistance. Le modèle de chien obèse a été validé pour de telles études (Bailhache et al., 2003b, Gayet et al., 2004a). De plus, il est possible de contrôler

précisément la composition du régime utilisé pour induire une prise de poids, et notamment la composition en acides gras, molécules fortement impliquées dans l'installation de l'insulinorésistance (Samuel et al., 2010). Cependant, tous les acides gras ne sont pas équivalents par rapport à ces perturbations métaboliques. En effet, on a clairement démontré que les acides gras saturés favorisent l'inflammation et l'insulinorésistance (Kennedy *et al.*, 2009) alors que les acides gras mono ou polyinsaturés sont plutôt protecteurs. Le flux d'AGNE provenant du tissu adipeux viscéral vers le foie pourrait donc influencer plus ou moins la physiologie hépatique en fonction de sa composition.

De plus, les adipokines secrétées par les adipocytes semblent aussi jouer un rôle important dans l'insulinorésistance (Balistreri et al., 2010), et peuvent être également relarguées dans la veine porte et agir sur le foie. Enfin, l'inflammation et l'hypoxie du tissu adipeux ont été récemment décrites comme conduisant à une dysfonction du tissu adipeux (Trayhurn *et al.*, 2008), et comme pouvant favoriser une réduction de la sensibilité à l'insuline. Ces différents paramètres n'ont pas été étudiés simultanément chez un modèle animal validé pour l'étude de l'insulinorésistance. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier ces paramètres dans notre modèle de chien obèse et insulinorésistant.

Le but de cette étude a donc été d'étudier, chez des animaux obèses et insulinorésistants, les différences métaboliques entre tissu adipeux viscéral et tissu adipeux sous-cutané. Pour cela, des biopsies de tissu adipeux ont été réalisées chez huit chiennes, obèses et insulinorésistantes. Afin de palier tout effet d'un changement de régime sur les résultats, ces animaux ont été maintenus sur un régime contrôlé pendant au moins 6 mois avant les prélèvements. La composition en acides gras des tissus adipeux a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse. De plus, les ARNm ont été extraits et des mesures d'expression de gènes ont été menées. Nous avons mesuré notamment l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique (Glut4, LPL, HSL, PPAR γ , SREPB-1c, FAS). De plus, les marqueurs de l'inflammation et de l'hypoxie ont été étudiés (TNF α , IL-1 α , IL-1 β , HIF-1 α), ainsi que l'expression de la leptine.

II.2 Article 2

Differences in fatty acid composition and gene expression in the visceral and subcutaneous adipose tissues of nutritionally controlled dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen

Soumis à British Journal of Nutrition

Differences in fatty acid composition and gene expression in the visceral and subcutaneous adipose tissues of nutritionally controlled dogs

Jérôme Le Bloc'h^{1,2}, Véronique Leray¹, Khadija Ouguerram² and Patrick Nguyen¹.

Human Nutrition Research Center of Nantes, France.

¹ Nutrition and Endocrinology Unit, National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, ONIRIS, Nantes, France.

² INSERM U915 Institut du Thorax, University Hospital, Nantes, France.

Running title: Visceral and subcutaneous adipose tissues

Key words: fatty acid, adipose tissue, cytokines, dog.

To whom correspondence should be addressed:

Prof. Patrick Nguyen

Unité de Nutrition et Endocrinologie

Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique

Site de la chantrerie, Boite postale 40706, 44307 Nantes Cedex 3, France

patrick.nguyen@oniris-nantes.fr

Tel: 33 (0)2 40 68 76 35, Fax: 33 (0)2 40 68 77 46

Abbreviations used:

AT: adipose tissue, FAS: fatty acid synthase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Glut4: glucose transporter 4, HIF-1 α : hypoxia inducible factor 1 α , HSL: hormone-sensitive lipase, IL-1: interleukine-1, IR: insulin resistance, LPL: lipoprotein lipase, SCAT: subcutaneous adipose tissue, SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c, TNF- α : tumor necrosis factor α , VAT: visceral adipose tissue

ABSTRACT

Obesity is characterized by an increase in adipose tissue (AT) mass. Visceral adipose tissue (VAT) is suspected to have more deleterious consequences than subcutaneous adipose tissue (SCAT) in obesity, and it may be partly responsible for hepatic insulin resistance. The purpose of this study was to determine potential differences in fatty acid composition between VAT and SCAT, and to assess the expression of genes involved in lipid and glucose metabolism, inflammation and hypoxia in these two tissue types. The analysis of fatty acid content showed that there was a higher amount of saturated fatty acids in VAT than in SCAT. Conversely, the amount of monounsaturated fatty acids was lower in VAT. Moreover, the polyunsaturated fatty acid content was higher in VAT than in SCAT. The gene expression analysis showed that genes involved in inflammation (TNF- α , IL-1 α and IL-1 β) and hypoxia (HIF- α) were more highly expressed in VAT. The lower sensitivity of VAT to the antilipolytic effect of insulin was highlighted in this study by a higher expression of HSL in this AT. PPAR γ and SREBP-1c were expressed more highly in VAT than in SCAT, and, conversely, FAS and Glut4 had a lower expression in VAT. These results suggest that VAT had a higher hypoxia level and inflammation grade than SCAT, which could contribute to VAT insulin resistance.

INTRODUCTION

Obesity is characterized by an overgrowth of adipose tissue (AT) mass that is associated with insulin resistance (IR), dyslipidemia and increased risk for cardiovascular diseases (CVD). Several studies have shown that visceral adipose tissue (VAT) is less sensitive than subcutaneous adipose tissue (SCAT) to the antilipolytic effect of insulin^{31; 29; 20}. Therefore, VAT is suspected to be widely responsible for the high plasma non-esterified fatty acid (NEFA) concentrations that are observed in obese and insulin-resistant subjects and animals. Moreover, it has been described a relationship between VAT mass and the degree of overall body IR⁸, and VAT is generally considered to be more implicated in pathological situations than SCAT^{14; 24}.

A first portal theory was proposed to explain how VAT is involved in generating risk factors for CVD⁵. Extreme IR in the VAT leads to a high lipolysis rate²⁹, and VAT delivers massive amounts of NEFA to the liver via the portal vein, which is the primary cause of hepatic IR. Indeed, chronic exposure of the liver to an elevated NEFA flux or input can disturb the insulin signaling pathway, resulting in a decrease in hepatocyte insulin sensitivity, which can in turn promote dysregulated liver gluconeogenesis⁵¹, deplete the enzymes involved in NEFA oxidation, and increase hepatic lipogenesis⁴¹.

Some studies have suggested that a variety of adipokines favor IR, including tumor necrosis factor α (TNF- α)¹⁷ and resistin⁴⁴. On the other hand, adiponectin is known for its insulin-sensitizing effects, and has been described to be reduced by obesity¹³. Modification in production of VAT adipokines may be responsible for VAT IR and NEFA release through paracrine action⁴⁷. These adipokines may also be delivered to the liver via the portal vein, leading to a second portal theory.

Although both portal theories can explain how VAT is implicated in IR, few studies have provided molecular evidence in support of these theories. Kabir et al.²⁰ studied the

implications of VAT in hepatic IR in dogs fed a high-fat diet. They showed that the expression of genes promoting lipid accumulation and lipolysis (lipoprotein lipase [LPL], peroxisome proliferator-activated receptor γ [PPAR γ], and sterol regulatory element binding protein 1c [SREBP-1c]) was higher in VAT than in SCAT²⁰. Additionally, the authors observed a higher degree of hepatic steatosis and IR. However, these results have not been confirmed, and have not been extended to inflammation, adipokines expression, or to the mechanisms potentially implicated in hepatic IR.

Since portal NEFA flux may be one of the links between VAT and IR, variation in the composition of the NEFA released from VAT may also directly influence hepatic insulin sensitivity. Saturated fatty acids (SFA) are known to be more deleterious than monounsaturated fatty acids (MUFA) or polyunsaturated fatty acids (PUFA)^{23; 20; 22}. However, despite the putative link between AT fatty acids and liver IR, only a couple of studies have compared the fatty acid composition of VAT and SCAT in humans^{21; 34}, and results of these studies need to be confirmed due to the differences in food intake and the nutritional habits of the populations studied.

The purpose of the present study was to compare the fatty acid composition of VAT and SCAT in obese, insulin resistant dogs fed with a well-controlled diet. We also measured the expression of a number of the key genes involved in lipid and glucose metabolism, inflammation and hypoxia in both types of AT.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Eight, neutered, obese, insulin resistant, female dogs (mean age 2.7 ± 0.1 y) were included in this study. Before this study, young dogs (1.5 ± 0.1 y, 10.0 ± 0.4 kg) have been fed with a hyperenergetic diet (2.2 times the requirements for adult dog maintenance) in order to induce

obesity ($+93 \pm 11\%$ weight gain). Insulin sensitivity, measured by euglycemic hyperinsulinemic clamp, has been reduced due to obesity ($-56.8 \pm 7.4\%$). The obese body weight (19.2 ± 1.1 kg, $43.02 \pm 0.02\%$ fat mass) was then maintained for several months with a standard, dry (extruded) commercial diet (Medium adult; Royal Canin, Aimargues, France) (Table 1). The fatty acid composition of this diet is presented in Table 2. All dogs received their allocated rations in a single meal each day, and water was constantly available. All animals were housed at the National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, France, according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of Agriculture and Fisheries. The experimental protocol adhered to the European Union guidelines and was approved by the local Animal Use and Care Advisory Committee.

Fatty acid composition analysis

Chemicals

Solvents and chemicals were obtained from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France) or Grosseron (St-Herblain, France). Standard fatty acids for gas chromatography (GC) were obtained from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France) or Merck (Darmstadt, Germany).

Lipid extraction and fatty acid derivation

VAT and SCAT biopsies were obtained intraoperatively under anesthesia, following a 24-h unfed period. VAT was obtained from near the falciform ligament, and SCAT was obtained on the white line, i.e. *Linea alba*. Lipids from the ATs were extracted from approximately 100 mg of VAT or SCAT, homogenized in a mixture of dimethoxymethane/methanol (4/1, v/v), and dissolved in 1 mL of chloroform.

The total lipids from the VAT and SCAT were saponified for 30 min at 70°C in 1 mL of NaOH in methanol (0.5 mol.L^{-1}). Then, the lipids were methylated with 1 mL of 14%

boron trifluoride (BF₃) in methanol for 15 min at 70°C. Fatty acid methyl esters were extracted twice with pentane and analyzed by GC.

GC analysis

Fatty acid methyl esters (1 µL) were analyzed with an HP 6890 series instrument (Agilent Technologies, Massy, France). The instrument was equipped with a split injector (120:1) heated at 250°C and a bonded silica capillary column (30 m x 0.25 mm internal diameter; BPX70, SGE, Villeneuve-St-Georges, France) with a polar stationary phase of 70% cyanopropylpolysilphenylene-siloxane (0.25 µm film thickness). Helium was used as the carrier gas. The column temperature was initially 150°C, and it was ramped at 2°C·min⁻¹ to 220°C. The flame ionization detector temperature was 250°C.

The methyl ester peaks were identified based on the retention times obtained for methyl esters prepared from fatty acid standards. Moreover, a commercial fatty acid methyl ester mix (Supelco 37 component FAME mix; Supelco, Bellefonte, PA, USA) was regularly analyzed to confirm that the retention times were unchanged.

Analysis of VAT and SCAT gene expression

mRNA isolation

Approximately 100 mg of VAT or SCAT was cleaned in saline. TRIzol reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) was added, and the tissue was immediately frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted from frozen tissue using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions. The total RNA concentration was quantified using spectrophotometric absorbance at 260 nm.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed in a 20 µL reaction volume using random primers (Pharmacia, Saclay, Orsay, France) and superscript III reverse transcriptase (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions. Real time PCR analysis was performed using the 7000 Sequence Detection System with SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Table 3 lists the primers used to quantify PPAR γ , fatty acid synthase (FAS), LPL, glucose transporter 4 (Glut4), leptin, TNF- α , hormone-sensitive lipase (HSL), SREBP-1c, hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The expression levels were normalized using GAPDH as a housekeeping gene.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean (n = 8) \pm SEM. Significance was established using the paired Student's t-test using the Statview 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC). The differences were considered significant at a p-value less than 0.05.

RESULTS

VAT and SCAT fatty acid composition

Table 4 shows the fatty acid composition in SCAT and VAT, and the data are expressed as a percent of the total fatty acids. SFA were lower in SCAT than in VAT (p < 0.0001), mainly due to a higher proportion of palmitic acid (C16:0) in VAT (p < 0.0001). There was also a higher proportion of myristic acid (C14:0) in VAT than in SCAT (p < 0.01), while there was a lower proportion of octanoic acid (C8:0) in VAT (p < 0.05). The amount of MUFA in SCAT was higher than in VAT (p < 0.0001), particularly for the palmitoleic (C16:1 n-7) and oleic acids (C18:1 n-9) (p < 0.0001 and p < 0.001, respectively).

All of the n-6 fatty acids analyzed, except γ -linolenic acid (C18:3 n-6), were lower in SCAT than in VAT. This resulted in a lower total n-6 fatty acid content in SCAT ($p < 0.0001$). The total n-3 fatty acid content was higher in VAT than in SCAT ($p < 0.01$), and there was a higher amount of each type of n-3 fatty acid in VAT ($p < 0.05$ for each).

Expression of genes involved in lipid and glucose metabolism

The expression of PPAR γ , SREBP-1c, FAS, LPL, Glut4 and HSL in SCAT and VAT are presented in Fig. 1. The PPAR γ expression tended to be lower in SCAT than in VAT ($p = 0.08$). The expression of SREBP-1c and HSL was higher in VAT than in SCAT ($p < 0.05$ for both). The FAS and Glut4 expression was lower in VAT than in SCAT ($p < 0.05$ for both). The expression of LPL was lower in SCAT than in VAT, but we did not find any statistical differences.

Expression of genes involved in inflammation and hypoxia

The expression of the genes involved in inflammation and hypoxia (leptin, TNF- α , HIF-1 α , IL-1 α and IL-1 β) were higher in VAT than in SCAT ($p < 0.05$ for all) (Fig. 2).

DISCUSSION

In this study, we determined metabolic differences and variations in fatty acid composition and gene expression between VAT and SCAT in obese, IR dogs. This study is the first to assess the fatty acid composition of VAT and SCAT in obese, IR dogs that were fed a controlled diet. In previous studies, particularly those in humans, the exact fatty acid intakes were unknown because they were estimated from food-frequency questionnaires or prospective weight records. Since the results of these studies were based on the average composition of the AT, differences in food intakes may have resulted in huge variations

between subjects that could have partly hidden differences between VAT and SCAT. Fatty acid intakes have been generally controlled in animal studies^{33; 38}; however, it is important to have a good model to study the pathogenesis of IR. We have previously demonstrated that dogs fed a high-fat diet develop IR and other obesity-related disturbances that are similar to those observed in humans^{2; 3; 12}. Therefore, dog is a good model to carry out such studies.

Our results highlight important differences in fatty acid composition between VAT and SCAT in our model of obesity and IR. We observed a higher amount of SFA, particularly myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids, in VAT than in SCAT. Conversely, there was a lower amount of MUFA in VAT than in SCAT, which was mainly due to a lower proportion of palmitoleic (C16:1 n-7) and oleic (C18:1 n-9) acids. Additionally, the total proportion of PUFA was higher in VAT than in SCAT, mainly due to α -linoleic acid (C18:2 n-6). Our results match previous research, which showed that there was a higher amount of SFA in VAT than in SCAT in humans^{11; 28; 34}. This difference between the two ATs may be related to the higher stearyl-CoA desaturase activity in SCAT than in VAT that was observed in obese and IR patients⁴³. A second hypothesis could involve selective fatty acid mobilization^{35; 25}. Indeed, the mobilization of adipocyte fatty acids has been shown to be selective, and dependent on chain length, unsaturation and, to a lesser extent, positional isomerism³⁶. The relative mobilization rate of SFA is known to be lower than that of unsaturated fatty acids (mainly palmitoleic and oleic acids)^{36; 37}. Consequently, in AT, where the fatty acid turnover is elevated due to active lipolysis and lipogenesis, a higher level of SFA can be expected. The physiological result of these mechanisms could support adipose tissue fluidity. Because SCAT may have relative lower temperature due to its proximity to the skin surface, SCAT would have lower fluidity if its SFA content was similar to VAT. This could be counterbalanced by a higher stearyl-CoA desaturase activity in SCAT that would lead to a higher unsaturated fatty acid content, which would allow for higher lipid fluidity¹⁸.

A potential consequence of the higher SFA content in VAT is that the NEFA flux from VAT to the liver via the portal vein could be enriched in SFA. Such enrichment could be critical in establishing hepatic IR. SFA are deleterious fatty acids that have inflammatory and insulin-antagonizing effects ²². It is well known that high NEFA concentrations lead to activation of the proinflammatory nuclear-factor-kappaB pathway ^{7; 15}, which contributes to the establishment of hepatic IR and the inhibition of insulin suppression of glycogenesis ⁶. Moreover, high levels of palmitic acid (C16:0) have been shown to lead to IR due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rats ⁴⁰. Indeed, the mechanism by which fatty acids inhibit insulin action is probably due to an increase in fatty acid derivatives (i.e. acyl-CoA and diacylglycerols), which can decrease the activation of the insulin receptor substrate-1, thereby reducing insulin's actions ⁵⁴. In contrast with SFA, MUFA are often described as neutral or healthy fatty acids. Oleic acid (C18:1 n-9) decreases the accumulation of triglycerides in the liver ¹⁹ and lowers postprandial triglyceridemia ⁴⁵. Moreover, oleic acid may improve IR by reducing some of the inflammatory factors, such as TNF α , and interleukins 6, 7 and 18 ^{10; 46}. In summary, the higher levels of SFA and the lower levels of MUFA in VAT compared with SCAT may be responsible for the discharge of SFA to the liver due to the portal drainage of VAT, and lead to the development of hepatic IR. However, the higher PUFA proportion in VAT could be inconsistent with this hypothesis. Nevertheless, this is mainly a consequence of a higher n-6 PUFA concentration in VAT. There is evidence which suggests that n-6 PUFAs promote, while n-3 PUFAs inhibit, lipid accumulation within adipose depots, and this had led to the suggestion that the increasing dominance of n-6 over n-3 PUFAs in typical western diets may be one factor contributing to the increasing incidence of obesity ^{1; 27}. Moreover, it has been recently described a correlation between SREBP-1c mRNA expression and n-6 PUFA concentration in rat's VAT, suggesting a lipogenic effect of n-6 PUFA ³⁰. This study has also

highlighted that the pro-adipogenic effects of n-6 PUFAs in AT may be more potent than the anti-lipogenic effect of n-3 fatty acids. Thus, further studies are needed to clarify the importance of the higher n-6 PUFA in VAT compared to SCAT in our experimental model.

In addition to studying the fatty acid composition of AT, we also assessed the mRNA expression of genes involved in hypoxia and inflammation. Although the initiation of IR is not yet well characterized, AT inflammation is known to play a major role in AT IR¹⁷. Hypoxia has also been implicated in the dysregulation of AT function⁴⁸. Moreover, hypoxia interferes with insulin action in rodents model of obesity^{16; 53} and cultured human adipocytes⁵⁰. Recently, Pasarica et al. {Pasarica, 2010 #1054} have observed that a reduced oxygenation in human obese adipose tissue was associated with an impaired insulin suppression of lipolysis, highlighting the direct link between hypoxia and insulin resistance. Our results demonstrate that inflammatory (TNF α , leptin, IL-1 α and IL-1 β) and hypoxic (HIF-1 α) genetic markers were more highly expressed in VAT than in SCAT. The higher HIF-1 α mRNA expression in VAT could partly explain the higher inflammation grade. Several findings on human or mice adipocytes have shown that inflammatory markers, and notably leptin, are dependent on HIF-1 α activation^{9; 16}. Interestingly, expression of the key pro-inflammatory cytokine TNF α is not hypoxia sensitive. However, hypoxia may be the underlying cause of tissue inflammation and cellular dysfunction in obesity⁵². Moreover, phosphorylation of insulin receptor β and insulin receptor substrate 1 has been shown to be reduced in both mouse and human adipocytes via HIF-1 α dependent mechanisms³⁹. Thus, there is strong evidence for a central role of adipose tissue hypoxia in the induction of insulin resistance.

Our results confirmed that AT inflammation could be caused by cytokines, which likely played a significant role in adipocyte metabolism. VAT was shown to be a highly IR tissue²⁹, and higher levels of inflammation in VAT may account for the higher IR. Consistent

with this hypothesis and with previous studies ^{26; 49}, Glut4 expression, which is normally increased by insulin ^{4; 42}, was lower in VAT than in SCAT. Similarly, the lower response of VAT to the antilipolytic activity of insulin is another characteristic of IR ³¹ and in our study, the lower VAT response resulted in a higher expression of HSL in this tissue. The possibility exists that the higher lipolysis that we could expect, associated with the selective mobilization rate described above, could consequently lead to a higher SFA content in the portal NEFA flux. Kabir et al. ²⁰ also described higher HSL expression in VAT, which is consistent with increased lipolysis and elevated portal NEFA flux. Moreover, they demonstrated enhanced expression of gluconeogenic enzyme genes, increased liver triglyceride content, and decreased binding of insulin to its hepatic receptors. Taken together, these data suggest that VAT plays a major role in hepatic IR and in portal NEFA flux. Further studies will be necessary to demonstrate these mechanisms clearly.

In conclusion, we demonstrated that there are higher inflammatory and hypoxic grades in VAT than in SCAT. These differences may lead to higher IR in VAT. Consistent with the portal hypothesis, the higher content of VAT in SFA, which is associated with increases in inflammatory factors, may have deleterious effects on the liver and result in the development of hepatic IR and subsequent disturbances.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Samuel Ninet and Philippe Bleis for taking care of the animals, and for technical assistance.

STATEMENT OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest. All authors have contributed to the preparation of the manuscript and agree with the submitted manuscript content.

Literature Cited

1. Al-Hasani H & Joost HG (2005) Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**, 589-603.
2. Bailhache E, Nguyen P, Krempf M *et al.* (2003) Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* **52**, 559-564.
3. Bailhache E, Ouguerram K, Gayet C *et al.* (2003) 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**, 86-95.
4. Berger J, Biswas C, Vicario PP *et al.* (1989) Decreased expression of the insulin-responsive glucose transporter in diabetes and fasting. *Nature* **340**, 70-72.
5. Bjorntorp P (1990) "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* **10**, 493-496.
6. Boden G, Cheung P, Stein TP *et al.* (2002) FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E12-19.
7. Boden G, She P, Mozzoli M *et al.* (2005) Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* **54**, 3458-3465.
8. Chan DC, Watts GF, Sussekov AV *et al.* (2004) Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. *Diabetes Res Clin Pract* **63**, 77-85.
9. Chen B, Lam KS, Wang Y *et al.* (2006) Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 549-556.

10. Esposito K, Marfella R, Ciotola M *et al.* (2004) Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* **292**, 1440-1446.
11. Garaulet M, Perez-Llomas F, Perez-Ayala M *et al.* (2001) Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity. *Am J Clin Nutr* **74**, 585-591.
12. Gayet C, Bailhache E, Dumon H *et al.* (2004) Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNFalpha, IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **88**, 157-165.
13. Gil-Campos M, Canete RR & Gil A (2004) Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* **23**, 963-974.
14. Golay A, Chen N, Chen YD *et al.* (1990) Effect of central obesity on regulation of carbohydrate metabolism in obese patients with varying degrees of glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* **71**, 1299-1304.
15. Hommelberg PP, Plat J, Langen RC *et al.* (2009) Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E114-120.
16. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K *et al.* (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **56**, 901-911.
17. Hotamisligil GS (1999) Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107**, 119-125.
18. Hubbard RE & Garratt CJ (1980) The composition and fluidity of adipocyte membranes prepared from young and adult rats. *Biochim Biophys Acta* **600**, 701-704.

19. Hussein O, Grosovski M, Lasri E *et al.* (2007) Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* **13**, 361-368.
20. Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S *et al.* (2005) Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E454-461.
21. Karlsson M, Marild S, Brandberg J *et al.* (2006) Serum phospholipid fatty acids, adipose tissue, and metabolic markers in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)* **14**, 1931-1939.
22. Kennedy A, Martinez K, Chuang CC *et al.* (2009) Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* **139**, 1-4.
23. Keys A (1970) Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* **41**, 1-211.
24. Lafontan M & Girard J (2008) Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* **34**, 317-327.
25. Lafontan M & Langin D (2009) Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* **48**, 275-297.
26. Lefebvre AM, Laville M, Vega N *et al.* (1998) Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* **47**, 98-103.
27. Madsen L, Petersen RK & Kristiansen K (2005) Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 266-286.
28. Mamalakis G, Kafatos A, Manios Y *et al.* (2002) Abdominal vs buttock adipose fat: relationships with children's serum lipid levels. *Eur J Clin Nutr* **56**, 1081-1086.
29. Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL *et al.* (2002) Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes* **51**, 755-761.

30. Muhlhausler BS, Cook-Johnson R, James M *et al.* (2010) Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated Fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. *J Nutr Metab* **2010**.
31. Ostman J, Arner P, Engfeldt P *et al.* (1979) Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism* **28**, 1198-1205.
32. Pasarica M, Rood J, Ravussin E *et al.* Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 4052-4055.
33. Perona JS & Ruiz-Gutierrez V (2004) Virgin olive oil normalizes the altered triacylglycerol molecular species composition of adipose tissue in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* **52**, 4227-4233.
34. Pezeshkian M, Noori M, Najjarpour-Jabbari H *et al.* (2009) Fatty Acid Composition of Epicardial and Subcutaneous Human Adipose Tissue. *Metab Syndr Relat Disord*.
35. Raclot T (2003) Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Prog Lipid Res* **42**, 257-288.
36. Raclot T & Groscolas R (1993) Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. *J Lipid Res* **34**, 1515-1526.
37. Raclot T, Mioskowski E, Bach AC *et al.* (1995) Selectivity of fatty acid mobilization: a general metabolic feature of adipose tissue. *Am J Physiol* **269**, R1060-1067.
38. Radcliffe JD, Czajka-Narins DM & Imrhan V (2004) Fatty acid composition of serum, adipose tissue, and liver in rats fed diets containing corn oil or cottonseed oil. *Plant Foods Hum Nutr* **59**, 73-77.
39. Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T *et al.* (2009) Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* **58**, 95-103.

40. Reynoso R, Salgado LM & Calderon V (2003) High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Biochem* **246**, 155-162.
41. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D *et al.* (2003) Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* **77**, 43-50.
42. Sivitz WI, DeSautel SL, Kayano T *et al.* (1989) Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature* **340**, 72-74.
43. Sjogren P, Sierra-Johnson J, Gertow K *et al.* (2008) Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia* **51**, 328-335.
44. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S *et al.* (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312.
45. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T *et al.* (1999) Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* **69**, 1135-1143.
46. Tierney AC & Roche HM (2007) The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity. *Mol Nutr Food Res* **51**, 1235-1248.
47. Trayhurn P & Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* **60**, 329-339.
48. Trayhurn P, Wang B & Wood IS (2008) Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* **100**, 227-235.
49. Veilleux A, Blouin K, Rheaume C *et al.* (2009) Glucose transporter 4 and insulin receptor substrate-1 messenger RNA expression in omental and subcutaneous adipose tissue in women. *Metabolism* **58**, 624-631.

50. Wang B, Wood IS & Trayhurn P (2007) Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch* **455**, 479-492.
51. Williamson JR (1966) Mechanism for the stimulation in vivo of hepatic gluconeogenesis by glucagon. *Biochem J* **101**, 11C-14C.
52. Wood IS, de Heredia FP, Wang B *et al.* (2009) Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* **68**, 370-377.
53. Ye J, Gao Z, Yin J *et al.* (2007) Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1118-1128.
54. Yu C, Chen Y, Cline GW *et al.* (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**, 50230-50236.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 Relative expression of PPAR γ , SREBP-1c, FAS, LPL, Glut4, and HSL mRNA in VAT and SCAT. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 8). * p < 0.05, ** p < 0.001. (PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein 1c; FAS, fatty acid synthase; LPL, lipoprotein lipase; Glut4, glucose transporter 4; HSL, hormone-sensitive lipase).

FIGURE 2 Relative expression of leptin, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and HIF-1 α mRNA in VAT and SCAT. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 8). * p < 0.05. (TNF- α , tumor necrosis factor α ; HIF-1 α , hypoxia inducible factor 1 α ; IL-1 α , interleukin 1 α , IL-1 β , interleukin 1 β).

TABLES

Table 1: Diet nutrient profile. Analysis values are those provided by the manufacturer.

Nutrient	Content
Protein (%)	25.0
Fat (%)	14.0
Starch (%)	41.1
Total dietary fiber (%)	9.0
Metabolizable energy (kcal·g ⁻¹)	4.0

Diet composition (wt:wt): Chicken meal (26%), corn (20.5%), corn flour (15%), rice (10%), wheat flour (8.2%), pork rind fat (7.1%), natural flavors (3.1%), beet pulp (2.5%), yeast (1%), soya bean oil (1%), fish oil (0.7%), L-tyrosine (0.4%), potassium chloride (0.38%), sodium tripolyphosphate (0.3%), brewers yeast extract (source of mannan-oligosaccharides) (0.2%), choline chloride (0.1%), dried egg powder (0.1%), vitamins [dl-alpha tocopherol (source of vitamin E) (500 mg·kg⁻¹), L-ascorbyl-2-polyphosphate (source of vitamin C) (200 mg·kg⁻¹), biotin (0.8 mg·kg⁻¹), D-calcium pantothenate (30 mg·kg⁻¹), vitamin A acetate (13 000 IU·kg⁻¹), niacin (30 mg·kg⁻¹), pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) (4 mg·kg⁻¹), thiamine mononitrate (vitamin B1) (8 mg·kg⁻¹), riboflavin (vitamin B2) (6 mg·kg⁻¹), folic acid (1 mg·kg⁻¹), vitamin B12 supplement (0.2 mg·kg⁻¹), vitamin D3 supplement (1000 IU·kg⁻¹)], trace minerals [zinc as zinc oxide (187 mg·kg⁻¹), iron as ferrous sulfate (43 mg·kg⁻¹), copper as copper sulfate (15 mg·kg⁻¹), manganese as manganous oxide (56 mg·kg⁻¹), iodine as calcium iodate (3 mg·kg⁻¹), selenium as sodium selenite (0.1 mg·kg⁻¹)], preserved with butylated hydroxyanisole (BHA) and propyl gallate.

Table 2: Fatty acid composition of the standard diet.

Fatty acid	% of total fatty acids
C8:0	0.00
C12:0	0.09
C14:0	1.24
C14:1 n-5	0.00
C15:0	0.09
C16:0	21.79
C16:1 n-7	3.54
C18:0	8.62
C18:1 n-9	38.50
C18:2 n-6	17.52
C18:3 n-6	0.13
C18:3 n-3	1.69
C20:0	0.19
C20:1 n-9	0.67
C20:2 n-6	0.33
C20:3 n-6	0.10
C20:4 n-6	0.41
C20:5 n-3	0.59
C24:0	0.00
C22:6 n-3	0.29
nd	4.21

nd: not determined

Table 3: Sense/antisense primers used for the relative quantification of PPAR γ , SREBP-1c, FAS, LPL, Glut4, HSL, leptin, TNF- α , HIF-1 α , IL-1 α , IL-1 β and GAPDH.

Gene	Sense (5' \rightarrow 3')	Antisense (5' \rightarrow 3')
PPAR γ	GGATTCTCCAGCATTTC	GAGTTGGAAGGCTCTTCGTG
SREBP-1c	CTGGTAGTGGACACTGAGAAGC	GTTGATGGAGGAACGGTAGCG
FAS	TGGAGGTGCTGGCTGGTGATG	TGGCGGTCGGTGGCTGTG
LPL	ACAGTCAAGGCTGAGAACGG	CCACAACATACTCAGCACCAGC
Glut4	GCTTTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTGCTTGTCCAGTTGCAGA
HSL	TCAGCCACCGTGAGAGTAAGC	TGGAGGTGAGATGGTGACTGTG
Leptin	GACAAGCAACTTCATCATTGGC	AGGAAGGTGAAGATGAAGAAGG
TNF- α	CTTCTCGAACCCAAGTGAC	ACCCATCTGACGGCACTATC
HIF-1 α	CATGCTTTGGACTCTGACCA	ATCCAATGCACTGTGGTTGA
IL-1 α	TTTTCTTTTGGGAGCGTCAT	CAAGGCTGGGTTTCCAGTAA
IL-1 β	TCTGAGGCATTTTCGTGTCAG	TATCCGCATCTGTTTTGCAG
GAPDH	ACAGTCAAGGCTGAGAACGG	CCACAACATACTCAGCACCAGC

Table 4: Fatty acid composition of VAT and SCAT (expressed as % of total fatty acids).

Fatty acid	VAT	SCAT
C8:0	0.16 ± 0.06	0.37 ± 0.06 #
C12:0	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C14:0	1.44 ± 0.10	1.18 ± 0.11 ##
C15:0	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.01
C16:0	14.09 ± 0.44	10.27 ± 0.46 ####
C18:0	4.28 ± 0.51	3.26 ± 0.38
C20:0	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.01
C24:0	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01
SFA	20.22 ± 0.70	15.31 ± 0.69 ####
C14:1 n-5	0.22 ± 0.02	0.36 ± 0.03
C16:1 n-7	8.51 ± 0.43	12.01 ± 0.31####
C18:1 n-9	49.80 ± 0.67	53.35 ± 0.72 ##
C20:1 n-9	0.57 ± 0.02	0.46 ± 0.02 ##
MUFA	59.10 ± 0.75	66.19 ± 0.76 ####
C18:2 n-6	17.44 ± 0.14	15.60 ± 0.10 ####
C18:3 n-6	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01
C20:2 n-6	0.21 ± 0.03	0.13 ± 0.01 #
C20:3 n-6	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.02 ##
C20:4 n-6	0.42 ± 0.03	0.16 ± 0.03 ####
n-6 PUFA	18.24 ± 0.18	16.01 ± 0.13 ####
C18:3 n-3	1.00 ± 0.05	0.83 ± 0.03 #
C20:5 n-3	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01 #
C22:6 n-3	0.22 ± 0.04	0.09 ± 0.02 #

n-3 PUFA	1.27 ± 0.09	0.93 ± 0.05 ##
nd	1.16 ± 0.15	1.56 ± 0.08

Data are expressed as mean ± SEM. nd: not determined. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.0001.

Figure 1:

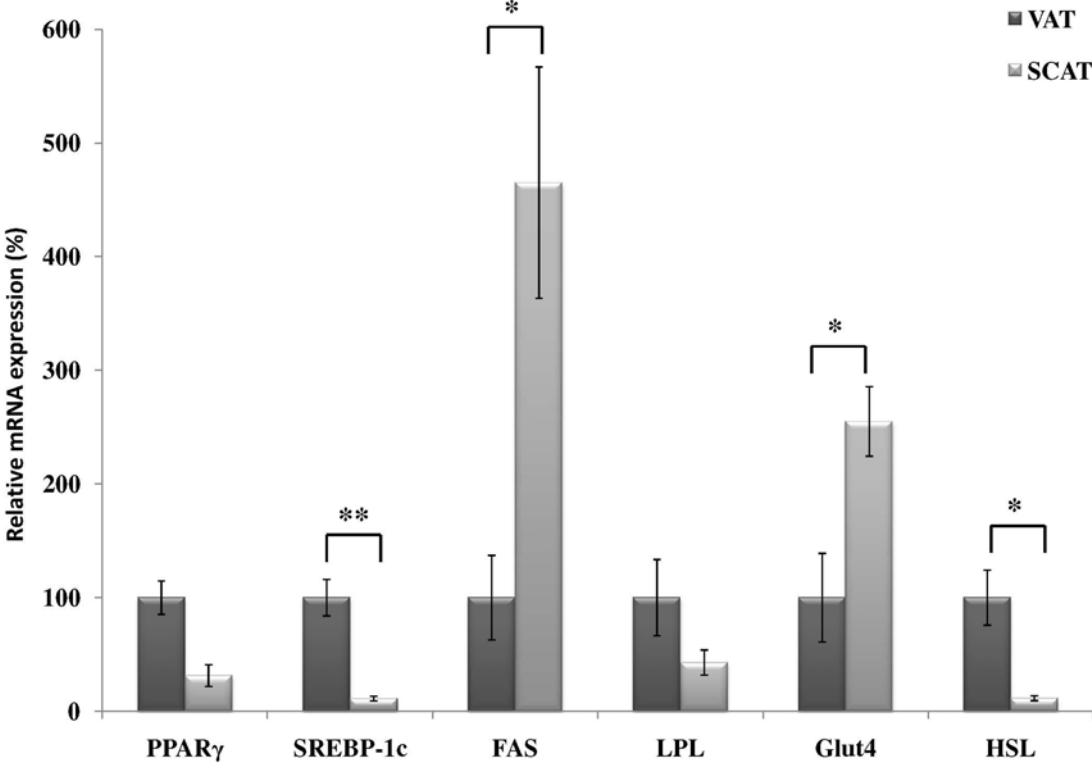
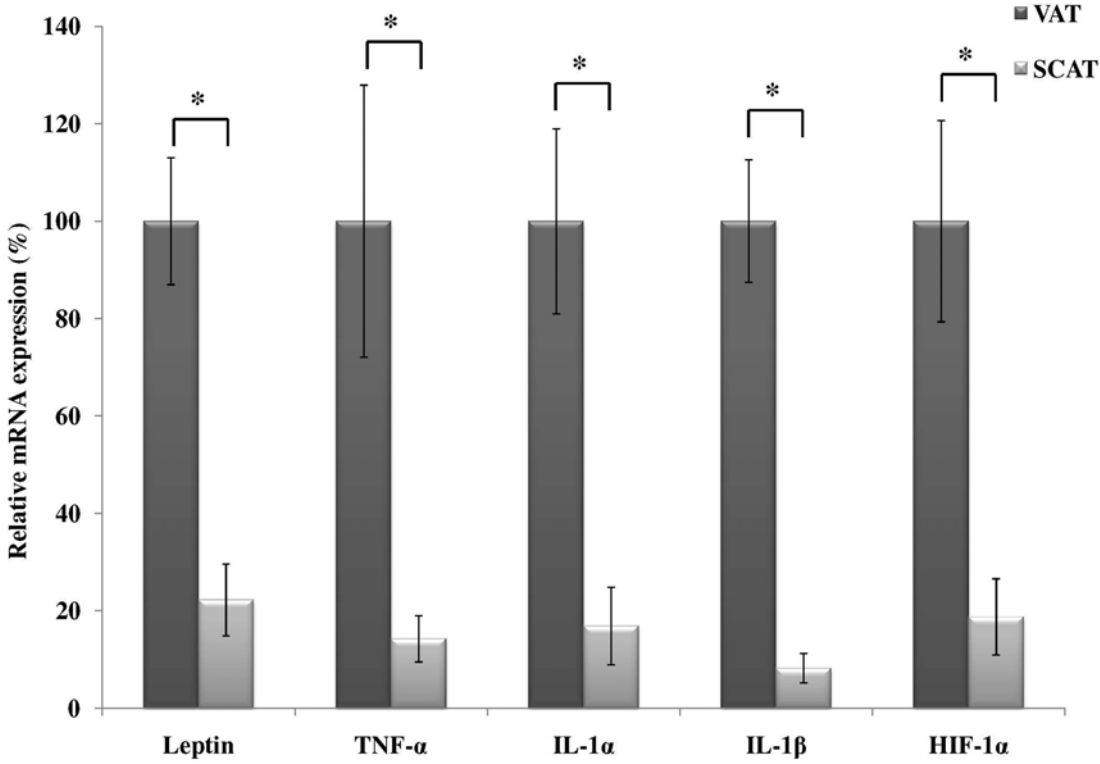


Figure 2:



II.3 Discussion

L'implication du tissu adipeux viscéral dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 a été clairement démontrée (Lafontan and Girard, 2008). On a également montré une corrélation entre la sensibilité à l'insuline et la masse du tissu adipeux viscéral (Chan *et al.*, 2004). Dans cette étude, nous montrons que le tissu adipeux viscéral est plus riche en acides gras saturés que le tissu adipeux sous-cutané. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment chez l'Homme (Pezeshkian *et al.*, 2009, Karlsson *et al.*, 2006). Ces précédentes études sont cependant critiquables du fait du manque de contrôle des régimes des patients, ainsi que du fait d'une forte variabilité dans leurs habitudes nutritionnelles. Dans notre étude, les animaux ont été soumis à un régime contrôlé pendant au moins 6 mois avant les prélèvements. Ces différences dans la composition en acides gras observées sont donc le reflet de différences métaboliques entre les tissus. Celles-ci peuvent être expliquées par l'activité de la $\Delta 9$ désaturase, enzyme qui permet la formation des acides gras monoinsaturés et décrite comme étant plus active dans le tissu adipeux sous-cutané (Sjogren *et al.*, 2008). La plus forte proportion d'acides gras monoinsaturés (C16:1 n-7, C18:1 n-9 et C20:1 n-9) dans le tissu adipeux viscéral est en accord avec ce point. Nous montrons également des index de désaturation (C16:0/C16:1 et C18:0/C18:1) plus faibles dans le tissu adipeux sous-cutané, confirmant cette activité plus élevée de la $\Delta 9$ désaturase dans ce tissu. En effet, le rapport C16:0/C16:1 (plus que le rapport C18:0/C18:1 du fait de la forte proportion d'acide oléique dans les régimes) a été décrit comme un marqueur de l'activité de la $\Delta 9$ désaturase (Warensjo *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter qu'une forte activité de la $\Delta 9$ désaturase a été décrite comme étant liée à l'insulinorésistance (Vessby *et al.*, 2002), alors qu'inversement, une amélioration de la sensibilité à l'insuline est associée à une baisse de l'activité de la $\Delta 9$ désaturase. Il y a donc ici un paradoxe dans la mesure le tissu adipeux viscéral présente à la fois une plus forte insulinorésistance mais également une activité de la $\Delta 9$ désaturase plus faible en comparaison du tissu adipeux sous-cutané. Cependant, les études portant spécifiquement sur le tissu adipeux ont apportés des résultats divergents en ce qui concerne la relation entre index de désaturation et insulinorésistance (Sjogren *et al.*, 2008, Roberts *et al.*, 2009), en raison notamment de différences dans le site de prélèvement du tissu adipeux. Il est donc difficile de conclure sur ce point, d'autant plus que ces études ont été menées chez des hommes sains.

Une autre hypothèse pouvant expliquer les différences de composition en acides gras des tissu adipeux est qu'il existe une mobilisation sélective des acides gras dans les tissus métaboliquement actifs qui peut favoriser le stockage des acides gras saturés au sein du tissu adipeux (Raclot *et al.*, 1995).

Ces différences dans la composition en acide gras pourraient avoir des conséquences directes sur le tissu adipeux, et potentiellement sur le foie. En effet, les acides gras saturés sont connus pour leurs effets néfastes sur l'inflammation et la sensibilité à l'insuline (Kennedy *et al.*, 2009). Par exemple, l'acide palmitique (C16:0), dont la proportion est plus élevée dans le tissu adipeux viscéral, induit une insulino-résistance chez le rat en réduisant la phosphorylation du récepteur à l'insuline et de l'IRS1 (Reynoso *et al.*, 2003). Inversement, les acides gras monoinsaturés sont reconnus comme des acides gras neutres ou bénéfiques pour la santé. L'acide oléique (C18:1 n-9) réduit l'accumulation des triglycérides au niveau du foie (Hussein *et al.*, 2007) ainsi que la triglycéridémie post-prandiale (Thomsen *et al.*, 1999). De plus, l'acide oléique peut améliorer la sensibilité à l'insuline en réduisant certains marqueurs de l'inflammation tel que le TNF α ou les interleukines 6, 7 et 18 (Esposito *et al.*, 2004, Tierney and Roche, 2007). La teneur plus élevée en acides gras saturés dans le tissu adipeux viscéral, associée à la plus faible proportion en acides gras monoinsaturés, peut donc être un des mécanismes conduisant à l'insulino-résistance du tissu adipeux viscéral.

Cependant, les résultats concernant les acides gras polyinsaturés peuvent apparaître contraires à cette hypothèse. En effet, les acides gras polyinsaturés sont reconnus comme des acides gras bénéfiques en termes de santé, et leur proportion plus élevée dans le tissu adipeux viscéral peut être étonnante. Néanmoins, il faut noter que le principal acide gras polyinsaturé du tissu adipeux est l'acide linoléique (C18:2 n-6). En effet, il représente environ 90% des acides gras polyinsaturés de ce tissu. Or, on a montré que l'acide linoléique favorisait l'accumulation de lipides au sein du tissu adipeux (Madsen *et al.*, 2005) et pouvait accroître la lipogenèse ainsi que l'adipogenèse (Muhlhausler *et al.*, 2010). Ces résultats sont cohérents avec le fait que le tissu adipeux viscéral est sujet à une expansion plus importante que le tissu adipeux sous-cutané. Au final, les différences de proportion en acides gras polyinsaturés, notamment ceux de la famille n-6, peuvent donc apparaître comme cohérent par rapport aux autres résultats.

Nous mettons également en évidence des plus fortes activités de la lipolyse (expression élevée de la lipase hormono-sensible) et de la lipogenèse dans le tissu adipeux viscéral.

L'expression de Glut4, transporteur du glucose, est plus faible dans le tissu adipeux viscéral. Ces résultats sont cohérents avec la plus forte insulino-résistance du tissu adipeux viscéral décrite chez le chien (Kabir et al., 2005, Mittelman et al., 2002). En effet, l'insulino-résistance se caractérise par une hausse de la lipolyse (Ostman et al., 1979), ainsi que par une moindre capture du glucose par les cellules, soit du fait d'une réduction de l'expression de Glut4 (Sivitz et al., 1989), soit par une réduction de la translocation de Glut4 à la membrane (Krook et al., 2004). Nos résultats confortent donc la plus grande insulino-résistance du tissu adipeux viscéral précédemment décrite chez le chien (Kabir et al., 2005). Notre étude décrit également une plus forte expression du TNF α , des interleukines 1 α et 1 β dans le tissu adipeux viscéral, soulignant un niveau inflammatoire plus élevé. De plus, nous montrons que HIF-1 α , marqueur de l'hypoxie, est également plus exprimé dans ce tissu. Récemment, Pasarica et al. (2010) ont montré que l'hypoxie du tissu adipeux était associée à un moindre effet anti-lipolytique de l'insuline, soulignant le lien direct entre hypoxie et insulino-résistance au sein du tissu adipeux. De même, une relation entre inflammation et insulino-résistance a été également décrite (Hotamisligil, 1999). Comme l'hypoxie pourrait être la raison principale de l'inflammation du tissu adipeux et des dysfonctionnements cellulaires associés à l'obésité (Wood et al., 2009), nous pouvons émettre l'hypothèse que l'expansion du tissu adipeux en cas de balance énergétique excédentaire entraînerait une raréfaction de l'oxygène au niveau des adipocytes. Cette hypoxie pourrait par la suite entraîner une inflammation du tissu adipeux et une insulino-résistance.

Le tissu adipeux viscéral se caractérise donc dans notre étude par un niveau inflammatoire et hypoxique plus important que le tissu adipeux sous-cutané. Nous notons également une plus grande insulino-résistance de ce tissu qui conduit notamment à une lipolyse accélérée. Enfin, le tissu adipeux viscéral est plus riche en acides gras saturés, réputés comme délétères. Dans le cadre de l'hypothèse portale, ces caractéristiques peuvent conduire à un relargage important dans la veine porte d'acides gras saturés ainsi que de marqueurs de l'inflammation et de l'hypoxie qui pourraient avoir des effets délétères directs sur le foie. De nouvelles études sont cependant nécessaires afin de confirmer l'existence de ce relargage dans la veine porte et d'étudier son impact sur le foie.

III. Effets d'une supplémentation en EPA et DHA sur la dyslipidémie et la sensibilité à l'insuline chez le chien obèse et insulino-résistant

III.1 Introduction

Les acides gras polyinsaturés oméga 3 (EPA et DHA) sont bien connus pour leurs effets hypotriglycéridémisants (Davidson, 2006). Ils sont également intéressants pour le traitement du syndrome métabolique, et ce de 3 manières différentes. Tout d'abord, l'EPA et le DHA réduisent l'inflammation par l'intermédiaire des eicosanoïdes (Bagga et al., 2003), et de molécules plus récemment identifiées telles que les résolvines, docosatriènes et neuroprotectines (Serhan et al., 2004). Ensuite, ils agissent sur l'expression de différents facteurs de transcriptions (en particulier les PPARs et le SREBP-1c) et, par leur intermédiaire, corrigent partiellement la dyslipidémie (Davidson, 2006). Enfin, l'EPA et surtout le DHA modifient la fluidité des membranes cellulaires et, de ce fait, modulent la liaison de l'insuline à son récepteur (Haugaard et al., 2006, McCallum and Epan, 1995).

Malgré les nombreuses études sur le sujet, les effets des AGPI ω 3 sur la sensibilité à l'insuline ne sont pas clairement déterminés. En effet, on a montré que les AGPI ω 3 étaient capables de prévenir l'apparition d'une résistance à l'insuline lors d'une prise de poids chez l'homme (Delarue *et al.*, 2004). A l'inverse, les résultats des études s'intéressant aux effets des AGPI ω 3 chez des patients déjà insulino-résistants sont contradictoires. De nombreuses études n'ont pas mis en évidence de modification de la sensibilité à l'insuline (Delarue *et al.*, 2004), mais récemment, des études chez le rat ont montré une amélioration de celle-ci (D'Alessandro et al., 2000, Lombardo et al., 2007). Les études menées chez le chien semblent montrer que les AGPI ω 3 ne possèdent pas d'effets majeurs dans ce modèle animal, aussi bien en ce qui concerne les lipides plasmatiques (Harris, 1997a) que la sensibilité à l'insuline (Irvine et al., 2002). Il faut noter cependant que ces protocoles ont été conduits sur des animaux sains et que, par conséquent, les effets des AGPI ω 3 chez des animaux présentant une dyslipidémie et/ou une insulino-résistance ne peuvent pas en être déduits.

Afin d'étudier les effets des AGPI $\omega 3$ sur l'insulinorésistance, des chiens obèses et insulinorésistants (n = 8) ont reçu une supplémentation en EPA et DHA pendant 6 semaines (920 et 760 mg par jour respectivement). La sensibilité à l'insuline a été mesurée par la méthode de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinémique (Radziuk, 2000). La composition corporelle a été évaluée par la méthode de dilution isotopique. Les concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol, AGNE ont été mesurées avant et à la fin de la période de supplémentation. Des biopsies de foie, muscle squelettique, tissu adipeux viscéral et sous-cutané ont été réalisées et ont permis l'étude de leur composition en acides gras ainsi que de l'expression de gènes clé du métabolisme des lipides et du glucose.

III.2 Article 3

EPA and DHA supplementation improves insulin sensitivity and dyslipidemia in obese and insulin resistant dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Frédérique Durantou, Khadija Ouguerram, Patrick Nguyen

Soumis à Journal of nutrition

EPA and DHA supplementation improves insulin sensitivity and dyslipidemia in obese and insulin resistant dogs.

Jérôme Le Bloc'h ^{1,2}, Véronique Leray ¹, Frédérique Duranton ^{1,2}, Khadija Ouguerram ² and Patrick Nguyen ¹.

Running title: Omega 3 fatty acids in obese dogs.

Human Nutrition Research Center of Nantes, Nantes, France.

¹ Nutrition and Endocrinology Unit, National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, ONIRIS, Nantes, France.

² INSERM U915, University Hospital, Nantes, France.

To whom correspondence should be addressed.

Prof. Patrick Nguyen

Unité de Nutrition et Endocrinologie

Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique

ONIRIS, Site de la chantrerie

Boite postale 40706, 44307 Nantes Cedex 3, France

patrick.nguyen@oniris-nantes.fr

Tel: 33 (0)2 40 68 76 35

Fax: 33 (0)2 40 68 77 46

Key words: obesity, insulin sensitivity, omega 3 fatty acid, EPA, DHA, lipid metabolism, dog.

Abbreviations used

DHA: docosahexaenoic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, HDL: high density lipoprotein, I_{IS}: insulin sensitivity index, IR: insulin resistance, LDL: low density lipoprotein, NEFA: non esterified fatty acid, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, PUFA: polyunsaturated fatty acid, SCAT: subcutaneous adipose tissue, SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c, TC: total cholesterol, TG: triglyceride, VAT: visceral adipose tissue, VLDL: very low density lipoprotein.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a major health issue that is characterized by a cluster of metabolic abnormalities. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids, especially those from marine oil (EPA and DHA), appears to be efficient for limiting the emergence of this syndrome. The present work examined the effectiveness of a six weeks supplementation of EPA and DHA (920 mg.d⁻¹ and 760 mg.d⁻¹ respectively) to reverse or improve the dyslipidemia and insulin resistance that are associated with obesity in dogs. We demonstrated that EPA and DHA were able to reduce triglycerides and total cholesterol plasma concentrations by increasing lipid oxidation through PPAR α activation, and by reducing lipogenesis through SREBP-1c repression. We also showed that n-3 PUFA improves insulin sensitivity. Interestingly, we observed an accumulation of EPA and DHA in liver and skeletal muscle, two tissues strongly involved in insulin resistance establishment. Moreover, EPA and DHA accumulated in subcutaneous adipose tissue but not in the visceral one, while Glut4 expression has been increased only in subcutaneous adipose tissue. Besides the well-known effects of EPA and DHA on dyslipidemia, these results described a potential link between fatty acid composition of tissue and insulin sensitivity. However, further works are required to determine if the modification of membrane fatty acids affects directly the insulin signaling pathways or if the increase in insulin sensitivity only involves nuclear factors and modulation of gene expression.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome is defined as a cluster of metabolic abnormalities including among others insulin resistance (IR), dyslipidemia and obesity (1). The increasing prevalence of this syndrome leads to a higher risk of cardiovascular diseases and is therefore a major public health issue.

It's well-known that the composition of the macronutrients in the diet could affect several key factors of the metabolic syndrome. In this regards, numerous clinical and animal studies have shown benefic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), mainly on the cardiovascular diseases associated with metabolic syndrome (2, 3). The mechanisms that have been described showed that EPA and DHA could act through three different pathways. Firstly, n-3 PUFA have been shown to affect inflammation through eicosanoids synthesis (4). Secondly, EPA, and above all DHA, could also modify membrane-mediated process through the alteration of the fatty acid (FA) composition of membrane phospholipids, and consequently modulate the insulin receptor activity (5). Finally, n-3 PUFA are mainly known for their hypotriglyceridemic effect (6). Indeed, it has been shown that EPA and DHA decreases the lipogenesis by suppressing the nuclear abundance and hepatic expression of sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), and enhances FA oxidation through an activation of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) expression (7), leading to a reduction in triglyceride plasma concentration.

Most experimental studies examining the effect of n-3 PUFA on dyslipidemia and IR have focused on the prevention of these diseases, and have shown a real efficiency of EPA and DHA to protect against the emergence of such disorders (8). However, relatively few studies have examined the effectiveness of these FA in reversing diet-induced IR, and have reported conflicting results. It has been shown that n-3 PUFA do not restore insulin sensitivity in the liver (9), and appear to be no longer efficacious once type 2 diabetes is established (8). However, some

recent studies (10-12) have described an improvement of insulin sensitivity and dyslipidemia after a supplementation in n-3 PUFA by normalizing both the oxidative and non-oxidative glucose pathways, and by reducing adipocytes size, restoring partially their insulin sensitivity.

Surprisingly, among all animal studies, dogs have been described to be unaffected by n-3 PUFA supplementations (13-15), at least concerning plasma lipids and insulin sensitivity. However, these studies were conducted in healthy dogs, and it seems that the effects of n-3 PUFA in obese IR dogs have never been evaluated.

The purpose of this study was to assess the effect of an EPA and DHA supplementation on plasma lipids concentrations and on expression of genes involved in the regulation of these parameters. We also studied the modulation of insulin sensitivity by n-3 PUFA, potentially by modifying the tissues FA composition.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Eight, neutered, obese, insulin resistant, female dogs (mean age 2.7 ± 0.1 y) were included in this study. Before this study, young dogs (1.5 ± 0.1 y, 10.0 ± 0.4 kg) have been fed with a hyperenergetic diet (2.2 times the requirements for adult dog maintenance) in order to induce obesity ($+93 \pm 11\%$ weight gain). Insulin sensitivity, measured by euglycemic hyperinsulinemic clamp, has been reduced due to obesity ($-56.8 \pm 7.4\%$). The obese body weight (19.2 ± 1.1 kg, $43.02 \pm 0.02\%$ fat mass) was then maintained for several months with a standard, dry (extruded) commercial diet (Medium adult; Royal Canin, Aimargues, France) (Table 1). The fatty acid composition of this diet is presented in Table 2.

Dogs received an omega 3 supplementation during six weeks. This supplementation consisted in 2 capsules of 1 gram of ethylic ester of EPA and DHA ($920 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ and $760 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ respectively, Omacor, Laboratoire P. Fabre, Castres, France). All animals were housed at the National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, France, according to the regulations for animal welfare of the French Ministry of agriculture and Fisheries. The experimental protocol was adhered to European Union guidelines and was approved by the local Animal Use and Care Advisory Committee.

Plasma lipid and lipoprotein analysis

Jugular vein blood samples were collected into EDTA, following a 24-h unfed period, and then immediately centrifuged (at 4°C , $2124g$ for 10 min) and stored (-80°C) for further analysis. Lipoproteins from pooled plasma were separated as previously described (16) by fast-protein liquid chromatography (FPLC) system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA), and triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) were measured in each fractions. Plasma TG, TC and non

esterified fatty acids (NEFA) were assessed using enzymatic methods (Cholesterol RTU, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France; Triglycerides enzymatique TG PAP150, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France ; NEFA C, WAKO, Oxoid, Dardilly, France).

Body composition

Body composition (body fat mass, lean mass) was determined using isotopic dilution. D₂O (99.9% D/H; Eurisotop, Gif-sur-Yvette, France) was injected subcutaneously into 24h-unfed dogs, with a jugular vein blood sample collected into heparin 5 hours later. The blood sample was centrifuged at 4°C, 2124 g for 10 min, and plasma deuterium concentration assayed using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Brüker SA, Wissembourg, France).

Euglycemic-hyperinsulinemic clamp

A 3-h euglycemic-hyperinsulinemic clamp was conducted in 24-h food-deprived dogs to determine *in vivo* insulin sensitivity, as previously described (17). Briefly, human insulin (Actrapid; NovoNordisk, Bagsvaerd, Denmark) was infused (via a catheter placed in a cephalic vein) to induce hyperinsulinemia (4 mU.kg⁻¹ for 1 min and 2 mU.kg⁻¹.min⁻¹ for the duration of the experiment). Glucose (Glucose 20%; Laboratoire Aguetant, Lyon, France) was clamped at basal levels by adjustment of the glucose infusion rate in the cephalic vein. Blood samples were drawn from a jugular catheter every 5 min from 0 to 60 min and every 10 min from 60 to 180 min. These samples were placed in ice-cold heparinized tubes and centrifuged at 4°C, 2724 g for 10 min and stored at -80°C for further insulin analysis. In accordance with Radzuik et al. (18), insulin sensitivity index (I_{IS}) was defined as the mean glucose infusion rate (mg.kg⁻¹.min⁻¹) divided by the mean plasma insulin concentration (μU.mL⁻¹) of the last 60 min of the clamp. Rapid determination of blood glucose during clamping was achieved using the glucose oxidase

method (Glucotrend® Plus; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma insulin concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay kit (RIA Insik-5; Diasorin, Saluggia, Italy).

Fatty acid composition analysis

Chemicals

Solvents and chemicals were obtained from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France) or Grosseron (St-Herblain, France). Standard FA for gas chromatography (GC) were from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France) or Merck (Darmstadt, Germany).

Lipid extraction and fatty acid derivation

Tissues biopsies (liver, muscle, visceral adipose tissue [VAT] and subcutaneous adipose tissue [SCAT]) were obtained intraoperatively under anesthesia, following a 24-h unfed-period. Lipids from tissues were extracted from approximately 100 mg, homogenized in a mixture of dimethoxymethane/methanol (4/1 v/v) and dissolved in 1 mL of chloroform.

Total lipids were saponified for 30 min at 70°C by 1 mL of NaOH (0.5 mol.L⁻¹ in methanol) and then methylated with 1 mL of BF₃ (14% in methanol) for 15 min at 70°C. FA methyl esters were extracted twice with pentane and analyzed by GC.

Gas chromatography analysis

1 µL FA methyl esters were analyzed with an HP 6890 series (Agilent technologies, Massy, France) with a split injector (120:1) heated at 250°C, and a bonded silica capillary column (30 m x 0.25 mm internal diameter; BPX70, SGE, Villeneuve-St-Georges, France) with a polar stationary phase of 70% cyanopropylpolysilphenylene-siloxane (0.25 µm film thickness). Helium

was used as the carrier gas. The column temperature program started at 150°C and ramped at 2°C.min⁻¹ to 220°C. The flame ionization detector temperature was 250°C.

Identification of methyl ester peaks was based on retention times obtained for methyl esters prepared from standard FA. Moreover, a commercial FA methyl ester mix (Supelco 37 component FAME mix; Supelco, Bellefonte, PA, USA) was regularly analyzed to confirm the unchanged retention times.

Analysis of gene expression

mRNA isolation

Approximately 100 mg of tissue was cleaned in saline. TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added, and the tissue was immediately frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted from frozen tissue using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was quantified by spectrophotometric absorbance at 260 nm.

Semiquantitative RT-PCR

Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed in a 20 µL reaction volume using random primers (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) and superscript II reverse transcriptase (according to the manufacturer's instructions, Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Real time PCR analysis was performed on the 7000 Sequence Detection System with SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers used for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), lipoprotein lipase (LPL), sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), glucose transporter 4 (Glut4), adiponectin, hormone-sensitive lipase (HSL) and glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) are listed in table 3. Expression levels were normalized using GAPDH as housekeeping gene.

Statistical analysis

Data are expressed as mean (n=8) \pm SEM. Significance was established using a paired Student's t-test or a Wilcoxon test using the Statview 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC). The differences were considered significant at a p-value of less than 0.05.

RESULTS

Body weight, body composition, insulin sensitivity, plasma lipids and lipoprotein concentrations

Omega 3 supplementation did not affect dog's body weight or body composition (table 4) but we measured an increase in insulin sensitivity ($p < 0.05$). Omega 3 also reduced plasma TG and TC concentrations ($p < 0.05$). Glycemia, insulinemia and NEFA plasma concentration did not change.

The lipoprotein analysis showed that the decrease in plasma TG at the end of the omega 3 supplementation was due to a reduction in TG content in both VLDL (sum of fractions 1 to 10) and HDL (sum of fractions 30 to 55) (figure 1A). Concerning the cholesterol, the supplementation reduced the cholesterol in LDL (sum of fractions 11 to 29) (figure 1B). Moreover, we observed that cholesterol in HDL (sum of fractions 30 to 55) was eluted later at the end of omega 3 supplementation than at basal state, suggesting an increase in the average density of the HDL particles.

Fatty acids composition

Liver

The supplementation reduced the liver omega 6 content (table 5) due to a reduction in arachidonic acid (C20:4 n-6) ($p < 0.05$). We also showed an increase in α -linolenic acid (C18:3 n-3), EPA (C20:5 n-3) and DHA (C22:6 n-3) ($p < 0.05$), leading to a higher content in total ω 3 fatty acids ($p < 0.05$).

Muscle

The omega 3 supplementation reduced C24:0 amount in the muscle (table 5), and increased C24:1 n-9 and EPA proportions ($p < 0.05$).

Adipose tissues

Except a decrease in α -linolenic acid at the end of the supplementation, we did not show any change in VAT FA composition (table 6). Conversely, SCAT analysis showed an accumulation of EPA and DHA ($p < 0.05$) (table 6).

mRNA expression

Liver and muscle

We showed an increase in PPAR α hepatic expression at the end of omega 3 supplementation (+178%, $p < 0.05$) (figure 2). The hepatic LPL expression was not affected by PUFA as the muscle PPAR α expression.

Adipose tissues

Omega 3 fatty acids reduced SREBP-1c expression in VAT (-54%, $p < 0.05$) (figure 3), and increased the PPAR γ (+165%, $p < 0.05$) and LPL expressions (+110%, $p < 0.05$). In VAT, HSL, adiponectin and Glut4 did not change.

In SCAT (figure 4), PPAR γ expression was increased (+117%, $p < 0.05$), as LPL (+106%, $p < 0.05$), HSL (+62%, $p < 0.05$) and Glut4 expressions (+213%, $p < 0.05$). SREBP-1c and adiponectin were not affected in SCAT.

DISCUSSION

This work focused on the analyses of several metabolic and molecular mechanisms concerning the effects of n-3 PUFA on the improvement of dyslipidemia and IR ensuing a long-term feeding of a high-fat diet to dogs. This study shows that, in this experimental model, dietary n-3 PUFA is associated with a number of effects that collectively act to reduce dyslipidemia and improve insulin sensitivity.

Effect on dyslipidemia

We observed a reduction in TG plasma concentration at the end of the n-3 supplementation due to a decrease in TG content of both VLDL and HDL. These results confirmed the well-known hypotriglyceridemic effects of EPA and DHA (6) that can be partly explained by the higher PPAR α expression in liver and the resulting increased lipid oxidation (19). Moreover, omega 3 led to a reduction in SREBP-1c expression in VAT that could lead to a reduced lipogenesis (6). And finally, we also showed an increase in LPL expression in both adipose tissues that could have increased VLDL lipolysis and therefore reduced the TG plasma concentration.

In this study, we observed a decrease in total cholesterol plasma concentration, which was mainly due to a lowered LDL-C concentration. This result is in contradiction with almost all human studies (20), in which no significant modification in cholesterol levels have been described after a treatment with omega 3 PUFA. However, animal studies are unclear (21), and doesn't permit to conclude on the effect of omega 3 PUFA on cholesterol in animals. Among all the studies conducted in dogs, fish oil has never been described to modify any serum lipid variables. However, to our knowledge, our study is the first one that used dyslipidemic dogs. In this species, and in these particular metabolic conditions, our study showed that EPA and DHA are efficient to reduce plasma cholesterol.

The HDL-C concentration did not change in our study, but we observed that the particles were eluted later. Thus, the average density of the particles has been increased by the supplementation that suggests a reduction in the size of the HDL particles. Among all the human studies, HDL-C is essentially unaffected by n-3 fatty acids treatments (20), and one more time, animal studies give contradictory results (21). Some investigations have shown an increase in HDL₂ subclass after n-3 PUFA supplementation (22, 23), but a change in HDL size has never been described. However, it has been shown that TG-enriched HDL are bigger than normal particles (24). A reduction in the HDL size has been previously shown after a HDL-TG lipolysis by hepatic lipase (25, 26). Consequently, a decrease in TG content of HDL could be consistent with a reduced HDL size. We can also hypothesize that the higher amount of small HDL could be due to a lower activity of LCAT since a lower HDL content in cholesteryl ester is associated with a reduced size of the particles. Previous studies are unclear about the effect of EPA and DHA on LCAT activity. This activity has been shown to be increased by EPA (27), but other authors did not show any change (28). Consequently, further investigations are needed to evaluate the effect of EPA and DHA on cholesterol esterification in dogs. Kinetic studies of apolipoprotein AI and cholesteryl esters are actually conducted to assess the effect of ω 3 on reverse cholesterol transport and to define a potent modulation of LCAT activity.

Effects on IR

Our study was conducted in IR dogs in which insulin sensitivity was assessed by the gold standard method, the euglycemic hyperinsulinemic clamp (18). In this condition, the main result of this study is probably that n-3 PUFA are able to improve insulin sensitivity in obese dogs without any effect on body weight, fat mass proportion or NEFA plasma concentration, various parameters implicated in IR. Omega 3 fatty acids have been described as useful tools to prevent

the establishment of IR (8), but their capacities to reduce it are more confused. Irvine et al. (15) have tested the impact of ω 3 on insulin sensitivity in healthy dogs by intravenous glucose tolerance test, and have not showed any differences. Conversely, it has recently been shown that fish oil could reduce IR in rats (10). The enhancement of insulin sensitivity that we have measured could be partly explained by the improvement of dyslipidemia, and by the higher lipid oxidation that we could expect due to PPAR α activation (19). The changes in FA composition of the tissues, notably in the liver and the muscle, could also be another explanation of the improvement of insulin sensitivity. Increasing evidences suggest that the FA composition of membrane lipids is a critical cellular factor which influences both the insulin secretion and its biological action (29-31). These higher amounts of EPA and DHA in the liver and the muscle, two important tissues for IR, may have induced changes in the structure and fluidity of cells membranes that could have directly affected insulin action. Finally, we showed that n-3 PUFA raised the PPAR γ expression in both adipose tissues. This transcription factor is well-known for controlling a large number of genes involved in lipid metabolism, but PPAR γ is also known for its insulin sensitizing effect (32). Consequently, in obese IR dogs, EPA and DHA seem to improve insulin sensitivity by acting on dyslipidemia, membranes fatty acid composition, and also on gene expression.

Effect on adipose tissue

Another result of this study is that VAT and SCAT have different response to dietary n-3 PUFA. We showed that EPA and DHA accumulate in SCAT but not in VAT. Moreover, as previously described (33), Glut4 expression did not change in VAT but increased in SCAT after omega 3 PUFA supplementation. Since a lower Glut4 expression is associated with IR (34), this increase in SCAT could be the reflect of a enhanced insulin sensitivity of subcutaneous adipocytes.

Interestingly, we observed such results only in the adipose tissue enriched in EPA and DHA. This potent link between fatty acid composition of adipose tissue and the insulin sensitivity of this adipose tissue should be therefore elucidated. Moreover, the translocation of Glut4 to the membrane has been described to be impaired by insulin resistance (35), and the effect of EPA and DHA on this translocation should be studied.

In conclusion, our study suggests some possible mechanisms through which EPA and DHA could improve dyslipidemia and IR in obese dogs. However, we showed a potential relationship between fatty acid composition of membranes and insulin sensitivity of a tissue. Further research in this area will contribute to our understanding of how these singular lipids impact upon the insulin signaling pathway and how IR could be modulate by dietary lipids.

1. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004 Jun;33:351-75, table of contents.
2. Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN, Manson JE. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA.* 1998 Jan 7;279:23-8.
3. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, et al. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation.* 2002 Apr 23;105:1897-903.
4. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 Sep;75:197-202.
5. McCallum CD, Epanand RM. Insulin receptor autophosphorylation and signaling is altered by modulation of membrane physical properties. *Biochemistry.* 1995 Feb 14;34:1815-24.
6. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 2006 Aug 21;98:27i-33i.
7. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 2001 Apr;131:1129-32.
8. Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev.* 2004 May-Jun;44:289-99.
9. Holness MJ, Greenwood GK, Smith ND, Sugden MC. Diabetogenic impact of long-chain omega-3 fatty acids on pancreatic beta-cell function and the regulation of endogenous glucose production. *Endocrinology.* 2003 Sep;144:3958-68.

10. Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem*. 2006 Jan;17:1-13.
11. Lombardo YB, Hein G, Chicco A. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids*. 2007 May;42:427-37.
12. D'Alessandro ME, Chicco A, Karabatas L, Lombardo YB. Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem*. 2000 May;11:273-80.
13. Cahill PD, Sarris GE, Cooper AD, Wood PD, Kosek JC, Mitchell RS, Miller DC. Inhibition of vein graft intimal thickening by eicosapentanoic acid: reduced thromboxane production without change in lipoprotein levels or low-density lipoprotein receptor density. *J Vasc Surg*. 1988 Jan;7:108-18.
14. Casali RE, Hale JA, LeNarz L, Faas F, Morris MD. Improved graft patency associated with altered platelet function induced by marine fatty acids in dogs. *J Surg Res*. 1986 Jan;40:6-12.
15. Irvine AJ, Butterwick R, Watson T, Millward DJ, Morgan LM. Dietary supplementation with (n-3) polyunsaturated fatty acids does not affect insulin sensitivity in healthy Labrador retriever dogs. *J Nutr*. 2002 Jun;132:1709S-10S.
16. 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.
17. 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 Apr;87:86-95.

18. Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec;85:4426-33.
19. Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, Rossbacher JC, Moore IK, Regittnig W, et al. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes.* 2007 Apr;56:1034-41.
20. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997 May;65:1645S-54S.
21. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *Am J Clin Nutr.* 1997 May;65:1611S-6S.
22. Franceschini G, Calabresi L, Maderna P, Galli C, Gianfranceschi G, Sirtori CR. Omega-3 fatty acids selectively raise high-density lipoprotein 2 levels in healthy volunteers. *Metabolism.* 1991 Dec;40:1283-6.
23. Mori TA, Vandongen R, Masarei JR. Fish oil-induced changes in apolipoproteins in IDDM subjects. *Diabetes Care.* 1990 Jul;13:725-32.
24. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1995 Jan 6;270:189-96.
25. Rashid S, Barrett PH, Uffelman KD, Watanabe T, Adeli K, Lewis GF. Lipolytically modified triglyceride-enriched HDLs are rapidly cleared from the circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Mar 1;22:483-7.
26. 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 Jun 24;107:3066-72.

27. Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Saker M, Merzouk S, Merzouk H, Hichami A, Madani S, Khan NA, Prost J. Serum lipoprotein composition, lecithin cholesterol acyltransferase and tissue lipase activities in pregnant diabetic rats and their offspring receiving enriched n-3 PUFA diet. *Gen Physiol Biophys*. 2008 Mar;27:3-11.
28. Calabresi L, Villa B, Canavesi M, Sirtori CR, James RW, Bernini F, Franceschini G. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism*. 2004 Feb;53:153-8.
29. Field CJ, Ryan EA, Thomson AB, Clandinin MT. Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem J*. 1988 Jul 15;253:417-24.
30. Haugaard SB, Madsbad S, Hoy CE, Vaag A. Dietary intervention increases n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in skeletal muscle membrane phospholipids of obese subjects. Implications for insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Feb;64:169-78.
31. Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*. 1991 Feb;40:280-9.
32. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Jun;25:331-6.
33. Peyron-Caso E, Fluteau-Nadler S, Kabir M, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Slama G, Rizkalla SW. Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. *Horm Metab Res*. 2002 Jul;34:360-6.

34. Sivitz WI, DeSautel SL, Kayano T, Bell GI, Pessin JE. Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature*. 1989 Jul 6;340:72-4.
35. Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Med Sci Sports Exerc*. 2004 Jul;36:1212-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: FPLC elution profile of pooled plasma at basal state (full line), and at the end of omega 3 supplementation (dashed line). A: triglyceride concentration in the different lipoproteins, B: cholesterol concentration in the different lipoproteins. Lipoproteins are separated depending on their density, the bigger particles (i.e. lower density, VLDL) are eluted firstly, and the smaller particles (i.e. higher density, HDL) at the end of the separation. The triglyceride and cholesterol concentration in each lipoprotein has been calculated by adding the concentration of the corresponding fractions. Fraction 1 to 10: VLDL, fraction 11 to 29: LDL, and fraction 30 to 55: HDL.

Figure 2: Relative expression of PPAR α and LPL mRNA in liver and PPAR α mRNA in muscle before and at the end of omega 3 supplementation. Values are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus baseline. (PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor α , LPL: lipoprotein lipase).

Figure 3: Relative expression of SREBP-1c, PPAR γ , LPL, HSL, adiponectin and Glut4 mRNA in VAT before and at the end of omega 3 supplementation. Values are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus baseline. (SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c, PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ , LPL: lipoprotein lipase, HSL: hormone-sensitive lipase, Glut4: glucose transporteur 4).

Figure 4: Relative expression of SREBP-1c, PPAR γ , LPL, HSL, adiponectin and Glut4 mRNA in SCAT before and at the end of omega 3 supplementation. Values are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus baseline. (SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c,

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ , LPL: lipoprotein lipase, HSL: hormone-sensitive lipase, Glut4: glucose transporteur 4).

Table 1: Nutrient profile of the commercial diet. Analysis values are provided by the manufacturer.

Nutrients	Standard diet
Protein (g/100g)	25.0
Fat (g/100g)	14.0
Starch (g/100g)	41.1
Total dietary fiber (g/100g)	9.0
Metabolizable energy (kcal/g)	4.0

Diet ingredients: Chicken meal (26%), corn (20.5%), corn flour (15%), rice (10%), wheat flour (8.2%), pork rind fat (7.1%), natural flavors (3.1%), beet pulp (2.5%), yeast (1%), soya bean oil (1%), fish oil (0.7%), L-tyrosin (0.4%), potassium chloride (0.38%), sodium tripolyphosphate (0.3%), brewers yeast extract (source of mannan-oligo-saccharides) (0.2%), cholin chloride (0.1%), dried egg powder (0.1%), vitamins [dl-alpha tocopherol (source of vitamin E) (500 mg/kg), L-ascorbyl-2-polyphosphate (source of vitamin C) (200 mg/kg), biotin (0.8 mg/kg), D-calcium panthotenate (30 mg/kg), vitamin A acetate (13 000 IU/kg), niacin (30 mg/kg), pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) (4 mg/kg), thiamine mononitrate (vitamin B1) (8 mg/kg), riboflavine (vitamin B2) (6 mg/kg), folic acid (1 mg/kg), vitamin B12 supplement (0.2 mg/kg), vitamin D3 supplement (1000 IU/kg)], trace minerals [zinc as zinc oxide (187 mg/kg), iron as ferrous sulfate (43 mg/kg), copper as copper sulfate (15 mg/kg), manganese as manganous oxide (56 mg/kg), iodine as calcium iodate (3 mg/kg), selenium as sodium selenite (0.1 mg/kg)], preserved with BHA and propyl gallate.

Table 2: Fatty acid composition of the standard diet (% of total fatty acids).

Fatty acid	% of total fatty acids
C8:0	0.00
C12:0	0.09
C14:0	1.24
C14:1 n-5	0.00
C15:0	0.09
C16:0	21.79
C16:1 n-7	3.54
C18:0	8.62
C18:1 n-9	38.50
C18:2 n-6	17.52
C18:3 n-6	0.13
C18:3 n-3	1.69
C20:0	0.19
C20:1 n-9	0.67
C20:2 n-6	0.33
C20:3 n-6	0.10
C20:4 n-6	0.41
C20:5 n-3	0.59
C24:0	0.00
C22:6 n-3	0.29
nd	4.21

nd: not determined

Table 3: Sense/antisens primers used for PPAR α , PPAR γ , SREBP-1c, LPL, Glut4, HSL, adiponectin and GAPDH relative quantification.

Gene	Sens (5' → 3')	Antisens (5' → 3')
PPAR α	TTATCACAGACACGCTCTCACC	GTGGACTCCGTAATGGTAGC
PPAR γ	GGATTCTCCAGCATTTC	GAGTTGGAAGGCTCTTCGTG
SREBP-1c	CTGGTAGTGGACACTGAGAAGC	GTTGATGGAGGAACGGTAGCG
LPL	ACAGTCAAGGCTGAGAACGG	CCACAACATACTCAGCACCAGC
Glut4	GCTTTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTGCTTGTCCAGTTGCAGA
HSL	TCAGCCACCGTGAGAGTAAGC	TGGAGGTGAGATGGTGACTGTG
Adiponectin	AACCTGGGGAAAGTGCCTAT	GGTGCCATCGTAGTGGTTTT
GAPDH	ACAGTCAAGGCTGAGAACGG	CCACAACATACTCAGCACCAGC

Table 4: Triglycerides (TG), total cholesterol (TC), non esterified fatty acid (NEFA) plasma concentrations, glycemia, insulinemia, body weight, body fat mass and insulin sensitivity index (I_{IS}) at basal state and at the end of the supplementation period. Data are expressed as mean ± SEM (n = 8). * p < 0.05.

	Basal state	Omega 3
TG (mmol.L ⁻¹)	0.94 ± 0.04	0.73 ± 0.06 *
TC (mmol.L ⁻¹)	6.64 ± 0.41	5.36 ± 0.30 *
NEFA (mmol.L ⁻¹)	0.86 ± 0.09	0.93 ± 0.09
Glycemia (mmol.L ⁻¹)	4.73 ± 0.08	4.61 ± 0.12
Insulinemia (μUI.mL ⁻¹)	20.0 ± 2.4	22.0 ± 3.2
BW (kg)	19.21 ± 1.11	18.73 ± 1.54
Fat mass (%)	43.20 ± 2.04	40.59 ± 2.87
I _{IS}	0.085 ± 0.009	0.103 ± 0.015 *

Table 5: Fatty acid (FA) composition (% of total FA) of liver and muscle total lipids. MUFA: monounsaturated fatty acid, nd: non determinate, PUFA: polyunsaturated fatty acid, SFA: saturated fatty acid. * $p < 0.05$ for omega 3 compared to basal state.

FA	Liver		Muscle	
	Basal state	Omega 3	Basal state	Omega 3
C8:0	1.78 ± 0.57	0.64 ± 0.06	0.41 ± 0.15	0.43 ± 0.16
C12:0	nd	0.40 ± 0.16	nd	nd
C14:0	0.03 ± 0.03	0.19 ± 0.10	0.84 ± 0.11	0.74 ± 0.03
C16:0	11.39 ± 0.40	11.50 ± 0.62	12.78 ± 0.58	11.76 ± 0.70
C18:0	24.66 ± 0.73	23.14 ± 0.97	7.53 ± 0.99	6.64 ± 0.55
C24:0	nd	nd	0.46 ± 0.09	0.25 ± 0.07 *
SFA	37.90 ± 0.87	35.90 ± 0.71	22.02 ± 1.24	19.83 ± 1.29
C14:1 n-5	nd	nd	0.20 ± 0.07	0.23 ± 0.03
C16:1 n-7	1.53 ± 0.26	1.95 ± 0.24	8.34 ± 0.95	8.92 ± 0.49
C18:1 n-9	15.70 ± 1.06	16.69 ± 1.38	39.58 ± 2.88	42.63 ± 2.75
C20:1 n-9	nd	nd	0.16 ± 0.06	0.20 ± 0.06
C24:1 n-9	2.32 ± 0.39	2.10 ± 0.11	nd	0.48 ± 0.12 *
MUFA	19.54 ± 1.25	20.75 ± 1.54	48.28 ± 3.88	52.45 ± 3.07
C18:2 n-6	15.17 ± 0.27	15.81 ± 0.44	20.72 ± 1.41	18.73 ± 0.85
C20:2 n-6	nd	0.56 ± 0.37	nd	nd
C20:3 n-6	1.32 ± 0.21	1.35 ± 0.15	0.31 ± 0.08	0.26 ± 0.05
C20:4 n-6	20.00 ± 0.77	15.02 ± 1.06 *	3.88 ± 0.84	3.33 ± 0.58
n-6 PUFA	36.48 ± 0.67	32.74 ± 0.64 *	24.91 ± 2.25	22.31 ± 1.33

C18:3 n-3	nd	$0.50 \pm 0.16^*$	0.49 ± 0.11	0.44 ± 0.07
C20:5 n-3	0.15 ± 0.10	$1.27 \pm 0.11^*$	0.25 ± 0.09	$0.59 \pm 0.11^*$
C22:6 n-3	4.37 ± 0.26	$6.01 \pm 0.54^*$	0.68 ± 0.14	0.89 ± 0.17
n-3 PUFA	4.51 ± 0.29	$7.77 \pm 0.61^*$	1.42 ± 0.13	1.91 ± 0.22
nd	1.50 ± 0.61	2.79 ± 0.55	2.56 ± 0.30	2.69 ± 0.34

Table 6: Fatty acid (FA) composition (% of total FA) of visceral and subcutaneous adipose tissue total lipids. MUFA: monounsaturated fatty acid, nd: non determinate, PUFA: polyunsaturated fatty acid, SFA: saturated fatty acid. * $p < 0.05$ for omega 3 compared to basal state.

FA	Visceral adipose tissue		Subcutaneous adipose tissue	
	Basal state	Omega 3	Basal state	Omega 3
C8:0	0.16 ± 0.06	0.08 ± 0.03	0.37 ± 0.06	0.26 ± 0.03
C14:0	1.44 ± 0.10	1.31 ± 0.09	1.18 ± 0.11	1.13 ± 0.11
C16:0	14.09 ± 0.44	13.33 ± 0.63	10.27 ± 0.46	10.07 ± 0.61
C18:0	4.28 ± 0.51	4.23 ± 0.28	3.26 ± 0.38	3.84 ± 0.50
C20:0	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
SFA	20.22 ± 0.70	19.21 ± 0.97	15.31 ± 0.69	15.50 ± 1.05
C14:1 n-5	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.29 ± 0.03
C16:1 n-7	8.51 ± 0.43	9.98 ± 0.65	12.01 ± 0.31	10.84 ± 0.52
C18:1 n-9	49.80 ± 0.67	50.52 ± 0.62	53.35 ± 0.72	53.91 ± 0.81
C20:1 n-9	0.57 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.50 ± 0.02
MUFA	59.10 ± 0.75	60.30 ± 1.20	66.19 ± 0.75	65.54 ± 1.22
C18:2 n-6	17.44 ± 0.14	17.56 ± 0.21	15.60 ± 0.10	15.94 ± 0.25
C18:3 n-6	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
C20:3 n-6	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.02
C20:4 n-6	0.42 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.25 ± 0.08
n-6 PUFA	18.24 ± 0.18	18.31 ± 0.26	16.01 ± 0.13	16.50 ± 0.28
C18:3 n-3	1.00 ± 0.05	0.85 ± 0.03 *	0.83 ± 0.03	0.75 ± 0.03
C20:5 n-3	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.04 *

C22:6 n-3	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.09 ± 0.02	$0.18 \pm 0.03^*$
n-3 PUFA	1.27 ± 0.09	1.16 ± 0.07	0.93 ± 0.05	1.03 ± 0.09
nd	0.86 ± 0.15	0.73 ± 0.06	1.18 ± 0.08	1.06 ± 0.06

Figure 1:

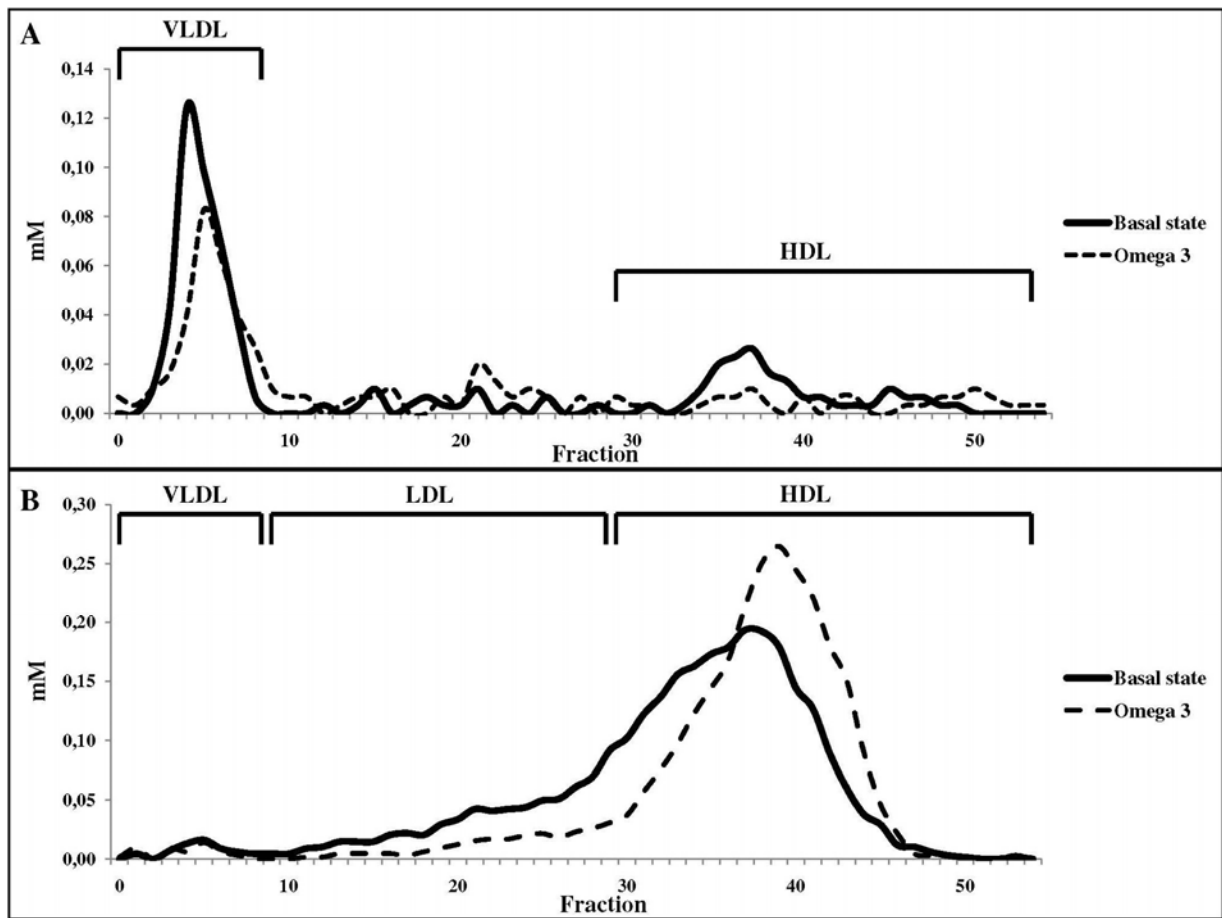


Figure 2:

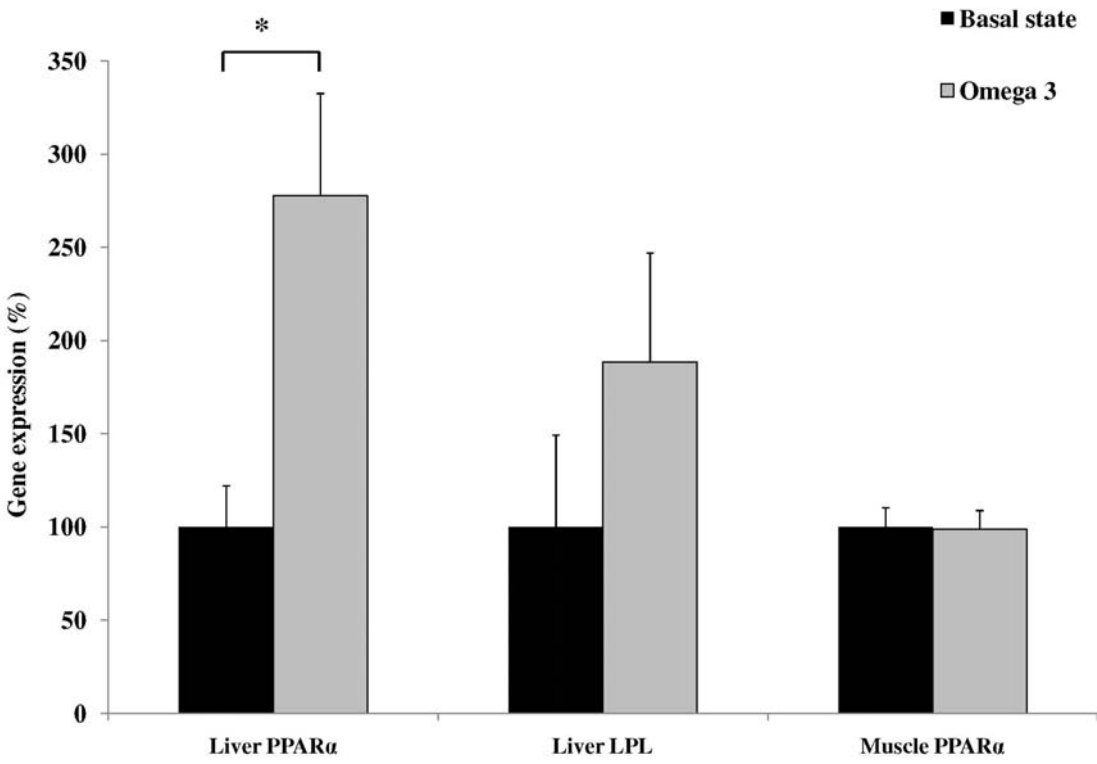


Figure 3:

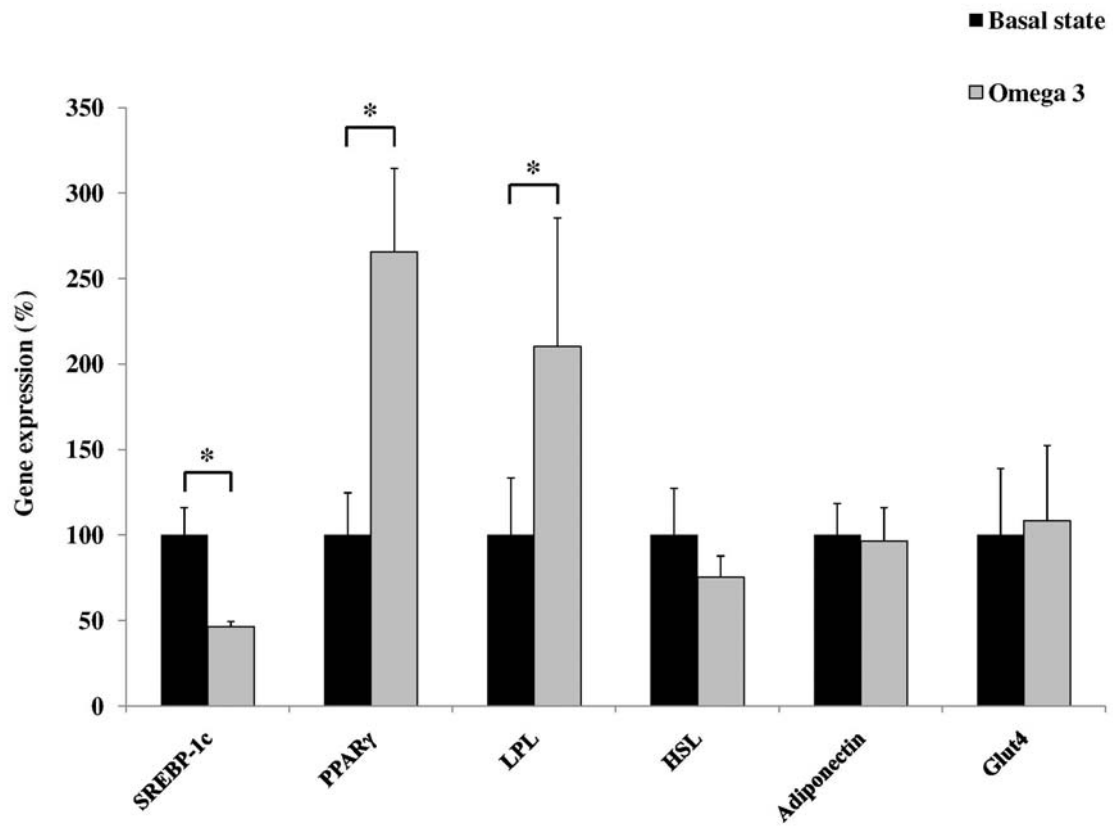
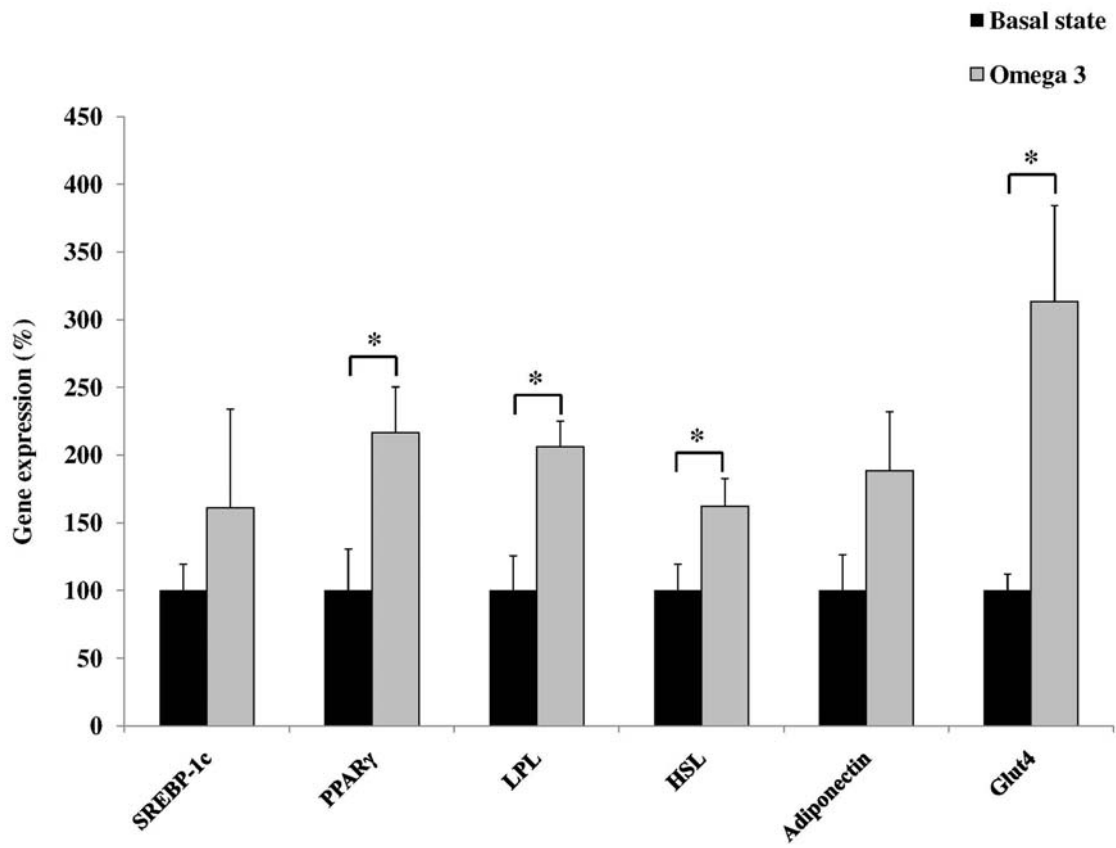


Figure 4:



III.3 Discussion

Dans cette étude, nous confirmons les effets hypotriglycéridémiantes des acides gras polyinsaturés $\omega 3$ puisque nous observons une diminution de la triglycéridémie d'environ 22%, réduction que l'on retrouve aussi bien au sein des VLDL que des HDL. La cholestérolémie est également diminuée par la supplémentation, principalement du fait d'une diminution du LDL-cholestérol. Notre étude montre donc qu'une supplémentation en EPA et DHA permet une correction partielle de la dyslipidémie chez le chien. Par rapport à la bibliographie, la réduction du cholestérol apparaît surprenante puisque les AGPI $\omega 3$ sont généralement reconnus comme ayant peu d'effets sur le cholestérol total (Harris, 1997b). Cependant, notre étude est la première à utiliser des chiens dyslipidémiques comme modèle animal, et cette condition physiologique particulière peut peut-être expliquer les résultats obtenus.

L'analyse des lipoprotéines par chromatographie montre que les particules de HDL sont éluées en moyenne plus tardivement à la fin de la supplémentation. Cette élution plus tardive signifie que la densité moyenne de HDL a augmenté, et que par conséquent leur taille a été réduite. Dans la mesure où les HDL riches en triglycérides ont été décrites comme étant plus grosses que les particules normales (Rye et al., 1995), la baisse des triglycérides au sein des HDL est en accord avec une taille réduite des particules.

La littérature existante décrit des effets contradictoires des acides gras polyinsaturés $\omega 3$ sur l'insulinorésistance. Dans ce cadre, notre étude est la première à utiliser le chien obèse et insulinorésistant, reconnu comme bon modèle animal d'étude de l'insulinorésistance (Bailhache et al., 2003a, Bailhache et al., 2003b), et à mesurer la sensibilité à l'insuline par la méthode de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinémique (Radziuk, 2000). Nous montrons une amélioration de la sensibilité à l'insuline à la fin de la supplémentation en EPA et DHA. Il est intéressant de noter que cette amélioration ne s'accompagne pas de changement du poids, de la composition corporelle ou de la concentration plasmatique en AGNE, différents paramètres influençant fortement la sensibilité à l'insuline et souvent jugés comme des facteurs responsables de l'installation de l'insulinorésistance.

Les résultats de mesures d'expression de gènes permettent en partie d'expliquer les effets des acides gras polyinsaturés $\omega 3$ chez le chien. En effet, la hausse de l'expression de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux favorise la lipolyse des triglycérides plasmatiques. De

plus, nous observons une hausse de l'expression hépatique du PPAR α à la fin de la période de supplémentation. On peut donc supposer qu'une augmentation de l'oxydation lipidique a eu lieu, entraînant une baisse des triglycérides plasmatiques (Neschen *et al.*, 2007). Enfin, l'expression du SREBP-1c est réduite dans le tissu adipeux viscéral, ce qui suggère une diminution de la lipogenèse.

En ce qui concerne l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, nous notons une augmentation de l'expression du PPAR γ dans les deux tissus adipeux. Le PPAR γ est reconnu comme un facteur de transcription insulinosensibilisant (Rangwala and Lazar, 2004) et son activation par les acides gras polyinsaturés ω 3 peut participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. De plus, l'accumulation de l'EPA et du DHA dans les tissus (foie et muscle notamment) peut participer aux effets bénéfiques des AGPI ω 3 sur la sensibilité à l'insuline. En effet, la composition en acides gras des membranes a été décrite comme un facteur essentiel influençant la sécrétion de l'insuline et son action biologique (Field *et al.*, 1988, Haugaard *et al.*, 2006, Storlien *et al.*, 1991). Dès lors, une accumulation d'EPA et de DHA peut modifier la fluidité membranaire et, par ce biais, la voie de signalisation de l'insuline. Cependant, de nouvelles études doivent être menées pour améliorer notre compréhension des effets des acides gras polyinsaturés ω 3 sur la voie de signalisation de l'insuline mais également pour étudier la modulation de l'insulinorésistance par les lipides alimentaires.

Un autre résultat intéressant de cette étude est la variation de la proportion en acide α linoléique (C18:3 n-3) dans le tissu adipeux viscéral et le foie. En effet, celle-ci diminue dans le tissu adipeux viscéral (et de manière non significative dans le tissu adipeux sous-cutané) alors qu'elle augmente dans le foie. Dans la mesure où cet acide gras n'est pas synthétisable par le chien, comme par l'ensemble des mammifères, et que son apport alimentaire n'a pas été modifié pendant l'étude, ces résultats sont surprenants. En ce qui concerne le foie, on peut supposer que l'augmentation de la proportion en acide α linoléique soit due à la moindre utilisation de celui-ci pour la formation des acides gras à plus longue chaîne. L'apport important d'EPA et de DHA a en effet pu réduire les besoins de synthèse endogène à partir de l'acide α linoléique. En revanche, la diminution de la proportion en C18:3 n-3 dans le tissu adipeux est plus difficilement compréhensible. L'apport alimentaire en acide α linoléique n'ayant pas été modifié pendant l'étude, il ne peut s'agir que d'une augmentation de l'utilisation de cet acide gras. Cette utilisation peut correspondre à trois voies métaboliques principales : 1) une β oxydation plus

importante, 2) une conversion en acide gras à longue chaîne plus élevée et 3) un relargage du tissu adipeux spécifique de l'acide α linoléique. Bien que la β oxydation soit une voie majeure du catabolisme de l'acide α linoléique (pour 60 à 85% de l'acide α linoléique) (Cunnane and Anderson, 1997), l'absence de modification de la proportion des autres acides gras peut nous faire douter d'un accroissement de la β oxydation. De la même façon, du fait de l'apport en EPA et DHA, la 2^{ème} hypothèse selon laquelle il y aurait une plus forte conversion de l'acide α linoléique en dérivés à longue chaîne n'est pas crédible. En effet, en raison de l'apport important d'EPA et de DHA par l'alimentation, il serait illogique d'observer une augmentation de leur synthèse. Il est donc par conséquent possible que la baisse de la proportion de l'acide α linoléique dans le tissu adipeux soit due à un relargage spécifique de cet acide gras. Il semblerait cependant que la mobilisation des acides gras du tissu adipeux soit dépendante de la longueur de la chaîne carbonée ainsi que du nombre d'insaturation, cette mobilisation augmentant en fonction du nombre d'insaturations et diminuant en fonction de la longueur de la chaîne (Raclot, 2003). Les acides gras sont donc sélectivement mobilisés en fonction de leur structure moléculaire et, parmi les acides gras polyinsaturés, les acides arachidonique et α linoléique semblent être ceux les plus relargués (Raclot et al., 1997). La réduction de la proportion en acide α linoléique dans le tissu adipeux viscéral nous apparaît donc surprenante et difficilement explicable.

Ce protocole soulève également la question du niveau de supplémentation. En effet, celui-ci est assez important puisque nous avons apporté 920 mg et 760 mg de DHA par jour. Etant donné que chez l'homme, les recommandations nutritionnelles sont de 250 mg d'EPA et 250 mg de DHA par jour (Legrand, 2010), cette étude est donc plus proche d'une étude pharmacologique que d'une étude nutritionnelle. Le choix de ce niveau de supplémentation a été fait en rapport du pourcentage de matière grasse du régime. En effet, chaque chien avait un apport quotidien en lipide d'environ 70 g par jour. Du fait de ce niveau élevé, la supplémentation devait être assez importante pour obtenir des effets mesurables, notamment en ce qui concerne la sensibilité à l'insuline. En effet, on a montré que la proportion des AGPI ω 3 devait être assez importante pour obtenir une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Lombardo and Chicco, 2006). Nous avons donc opté pour une dose élevée afin de s'assurer que la supplémentation ne s'apparente pas à « une goutte de lipide dans un océan de gras ».

Partie 2

**Effets de deux agents hypotriglycéridémiants sur le transport inverse du cholestérol
chez le chien obèse et insulino-résistant.**

Article 4

Nicotinic acid decreases apoB100-containing lipoprotein levels by reducing hepatic VLDL secretion through a possible DGAT2 inhibition in obese dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Maud Chétiveaux, Benjamin Freuchet, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen, Khadija Ouguerram

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010 334(2): 583-589

Article 5

Nicotinic acid accelerates HDL cholesteryl ester turnover in obese insulin resistant dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Hassan Nazih, Samuel Serisier, Muhammad-Quaid Zaman, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen and Khadija Ouguerram.

Soumis à l'European Journal of Pharmacology

Article 6 : résultats préliminaires

Effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur le transport inverse du cholestérol chez le chien obèse et insulino-résistant.

IV. Effets de l'acide nicotinique sur le métabolisme des lipoprotéines à apoB100

IV.1 Introduction

L'acide nicotinique (AN) est une molécule communément utilisée dans le traitement des dyslipidémies. En effet, l'AN réduit les concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol total et LDL-cholestérol (Goldberg *et al.*, 2000). Ces effets sur la dyslipidémie jouent un rôle important dans la réduction de la progression de l'athérosclérose observée après un traitement à l'AN (Taylor *et al.*, 2004), et favorisent la diminution des incidents cardiovasculaires. Cependant, les mécanismes hypolipidémisants de l'AN ne sont actuellement pas bien compris. Une inhibition de la lipase hormono-sensible a été suggérée du fait d'une réduction de la concentration plasmatique en AGNE dans les heures suivant l'administration de l'AN (Gille *et al.*, 2008), mais l'existence d'un rebond de cette concentration 3-4h suivant la prise du médicament suggère un effet de courte durée de l'AN sur la lipase hormono-sensible, et par conséquent l'existence d'autres cibles moléculaires.

Récemment, il a été montré une inhibition de la *diacylglycérol acyltransférase 2* (DGAT2) par l'AN (Ganji *et al.*, 2004). Cette enzyme permet l'estérification d'un acide gras sur un diacylglycérol, formant ainsi un triglycéride. Cette étape a été reconnue comme l'étape limitante de la synthèse des triglycérides. Une inhibition de la DGAT2 est donc en accord avec la réduction de la production de triglycérides observée *in vitro* (Jin *et al.*, 1999) et *in vivo* (Fabbrini *et al.*, 2010). Cette inhibition pourrait conduire à une réduction des triglycérides plasmatiques, mais à ce jour, aucune étude *in vivo* n'a clairement établi de lien entre la baisse de la triglycéridémie et l'activité de la DGAT2.

Cette étude s'est attachée à étudier les effets de l'AN sur le métabolisme des lipoprotéines à apoB100. Six chiens ont reçu un traitement à base d'AN à libération prolongée (375mg/jour pendant une semaine, puis 500 mg/jour pendant trois semaines). Parallèlement, trois animaux n'ont reçu aucun traitement afin d'éliminer tout effet du temps. La posologie utilisée a été basée sur les recommandations faites pour l'homme. En effet, afin d'éviter des effets secondaires trop importants, il est conseillé d'augmenter progressivement les doses d'AN pour arriver à 2 g/jour,

soit environ 30 mg/jour. Cette dose équivaut chez nos animaux à 500 mg/jour. L'intérêt majeur de notre protocole se situe dans l'approche cinétique du renouvellement des lipoprotéines à apoB100. En effet, une perfusion de ²H-Leucine a été réalisée pour chaque chien avant le début du traitement et à la fin de celui-ci. Cette technique particulière permet l'obtention des paramètres de renouvellement des lipoprotéines du fait du marquage de l'apoB100. De plus, au cours des 26h que dure ce protocole de marquage, nous avons mesuré la concentration plasmatique en AGNE. Enfin, des biopsies de foie et de tissu adipeux ont été réalisées afin de mesurer l'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse, l'assemblage et le catabolisme des VLDL.

IV.2 Article 4

Nicotinic acid decreases apoB100-containing lipoprotein levels by reducing hepatic VLDL secretion through a possible DGAT2 inhibition in obese dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Maud Chétiveaux, Benjamin Freuchet, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen, Khadija Ouguerram

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010 334(2): 583-589

Nicotinic Acid Decreases Apolipoprotein B100-Containing Lipoprotein Levels by Reducing Hepatic Very Low Density Lipoprotein Secretion through a Possible Diacylglycerol Acyltransferase 2 Inhibition in Obese Dogs

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Maud Chetiveaux, Benjamin Freuchet, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen, and Khadija Ouguerram

Human Nutrition Research Center of Nantes, Nantes, France (J.L.B., V.L., M.C., T.M., M.K., P.N., K.O.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U915 (J.L.B., M.C., T.M., M.K., K.O.), and Endocrinology Clinic (M.K.), University Hospital, Nantes, France; and Nutrition and Endocrinology Unit, ONIRIS, National College of Veterinary Medicine, Food Science, and Engineering, Nantes, France (J.L.B., V.L., B.F., P.N.)

Received February 19, 2010; accepted May 3, 2010

ABSTRACT

Apolipoprotein B100 (apoB100) is an essential component of very low density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL), both independent markers of cardiovascular risk. Nicotinic acid (NA) is an efficacious drug for decreasing VLDL and LDL, but the underlying mechanisms are unclear. For this purpose, six obese insulin-resistant dogs were given 350 mg/day of NA for 1 week and then 500 mg/day for 3 weeks. Turnover of apoB100-containing lipoproteins was investigated using stable isotope-labeled tracers. Multicompartmental modeling was used to derive kinetic parameters before and at the end of NA treatment. Hepatic diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), hepatic lipase (HL), and adipose lipoprotein lipase (LPL) mRNA expression was also determined. NA

treatment decreased plasma triglyceride (TG) ($p < 0.001$), VLDL-TG ($p < 0.05$), total cholesterol ($p < 0.0001$), and LDL cholesterol ($p < 0.05$), whereas plasma nonesterified fatty acids were unchanged. The decrease in VLDL-apoB100 concentration ($p < 0.001$) was the result of a lower absolute production rate (APR) ($p < 0.001$), despite a moderate decrease ($p < 0.05$) in fractional catabolic rate (FCR). LDL-apoB100 concentration was reduced ($p < 0.05$), an effect related to a decrease in LDL APR ($p < 0.05$) and no change in FCR. NA treatment reduced DGAT2 expression ($p < 0.05$), whereas MTP, HL, and LPL expression was unchanged. Our results suggest that NA treatment reduced VLDL and LDL concentration as a consequence of a decrease in VLDL production.

Metabolic syndrome is increasing worldwide (Bruce and Hanson, 2010), and the associated dyslipidemia is by far the strongest cardiovascular risk factor (Tenenbaum et al., 2006). The modified-release preparation of nicotinic acid (NA), which improves safety and reduces side effects compared with the crystalline form, was shown to decrease the progression of atherosclerosis (Taylor et al., 2004), notably by reducing plasma very low density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) (Goldberg et al., 2000), and could therefore be an appropriate treatment for these meta-

bolic syndrome patients. In humans, it has been reported that acute and chronic NA treatment decreases VLDL-triglyceride (TG) and LDL cholesterol (Kamanna and Kashyap, 2008). Because apolipoprotein B100 (apoB100) reflects directly the metabolism of VLDL and LDL, apoB100 labeling is used to assess the effect of drugs on VLDL and LDL (Duvillard et al., 2000; Maugeais et al., 2001; Pont et al., 2002; Ouguerram et al., 2003; Lamon-Fava et al., 2008). Using in vivo kinetics methods in subjects with hyperlipidemia [high level of TG and LDL cholesterol, low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentration], Lamon-Fava et al. (2008) have reported no change in VLDL production. In contrast, two studies in normolipidemic subjects (Wang et al., 2001) and in subjects with steatosis (Fabbrini et al., 2010) have

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.110.167478.

ABBREVIATIONS: NA, nicotinic acid; VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglyceride; HDL, high-density lipoprotein; apoB100, apolipoprotein B100; NEFA, nonesterified fatty acid; DGAT2, diacylglycerol acyltransferase 2; IR, insulin resistance; BW, body weight; I_{S} , insulin sensitivity index; FCR, fractional catabolic rate; APR, absolute production rate; TC, total cholesterol; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; HL, hepatic lipase; LPL, lipoprotein lipase.

reported lower VLDL production. These few divergent results were not sufficient to establish a strong conclusion.

The mechanism by which NA lowers VLDL-TG concentrations has not been fully identified. Because NA inhibits the hormone-sensitive lipase (Gille et al., 2008), it was suggested that the reduction of nonesterified fatty acid (NEFA) flux from adipose tissue to liver secondary to this inhibition by NA would decrease hepatic VLDL-TG production. However, a rebound in NEFA plasma concentration 3 to 4 h after NA treatment has been described previously (Wang et al., 2000), and over the long term no change in NEFA plasma level has been shown (Vega et al., 2005), highlighting the existence of another target for NA. Another hypothesis from *in vitro* experiments has suggested that NA would directly decrease hepatic TG synthesis (Jin et al., 1999) through the inhibition of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2), a key enzyme in TG synthesis (Ganji et al., 2004). Nevertheless, this inhibitory effect on TG synthesis and DGAT2 activity was observed with doses approximately 100-fold higher than plasma concentrations associated with maximal pharmacological effects of NA (Svedmyr et al., 1969).

To determine the effect of NA on the atherogenic apoB100-containing lipoprotein, as well as the underlying *in vivo* mechanisms, we have measured parameters of turnover of VLDL and LDL apoB100 using stable isotopes in obese and insulin-resistant (IR) dogs. We have also measured mRNA expression of genes implicated in the metabolism of apoB100-containing lipoproteins.

Materials and Methods

Animals and Treatment

Nine male beagle dogs [body weight (BW), 11.1 ± 0.8 kg; mean age, 1.8 ± 0.1 years] were overfed (1.6 times the National Research Council recommendation) during 60 weeks with a high-fat, dry (extruded) commercial diet (Medium Junior; Royal Canin, Aimargues, France). At the end of the 60 weeks, insulin sensitivity was assessed in obese animals (BW, 16.8 ± 0.7 kg) to ensure that animals were IR (Serisier et al., 2008).

Six obese IR dogs (obese + NA group) were given 375 mg/day of extended-release NA (Niaspan; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) for 1 week (approximately 22.7 mg/kg/day) and then 500 mg/day for 3 weeks (approximately 30.3 mg/kg/day), which corresponds to a standard treatment in humans (approximately 2 g/day). Hepatotoxicity parameters (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) have been measured and did not change between the beginning and the end of the treatment (data not shown). NA was administered orally each day before the meal. Three obese dogs did not receive NA treatment and served as a control group (obese group) to exclude drug-independent time effect. Experimental protocols adhered to European Union guidelines and were approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes.

Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp. A 3-h euglycemic-hyperinsulinemic clamp was conducted in 24-h food-deprived dogs to determine *in vivo* insulin sensitivity, as described previously (Bailhache et al., 2003b). Only five obese + NA dogs were studied for insulin sensitivity measurement because of technical problems. In brief, human insulin (Actrapid; NovoNordisk, Bagsvaerd, Denmark) was infused (via a catheter placed in a cephalic vein) to induce hyperinsulinemia (4 mU/kg for 1 min and 2 mU/kg/min for the duration of the experiment). Glucose (Glucose 20%; Laboratoire Aguetant, Lyon, France) was clamped at basal levels by adjustment of the glucose infusion rate in the cephalic vein. Blood samples were drawn from a jugular catheter every 5 min from 0 to 60 min and

every 10 min from 60 to 180 min. These samples were placed in ice-cold heparinized tubes and centrifuged at 4°C, 2724g for 10 min, and stored at -80°C for further insulin analysis. Insulin sensitivity index (I_{IS}) was defined as the mean glucose infusion rate [mg/(kg · min)] divided by the mean plasma insulin concentration (μ U/ml) of the last 60 min of the clamp (Radziuk, 2000). Rapid determination of blood glucose during clamping was achieved using the glucose oxidase method (Glucotrend Plus; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma insulin concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay kit (RIA Insik-5; Diasorin, Saluggia, Italy).

Kinetic Studies

Experimental Protocol. Kinetic studies were performed as previously described (Bailhache et al., 2004; Ouguerram et al., 2004) using an 8-h constant infusion of [5,5,5- 2 H $_3$]leucine, as labeled precursor of apoB100. All the dogs were in fasting state during all the experimental procedures. Approximately 1 h after drug administration, each animal received intravenously a primed constant tracer infusion [10 μ mol/(kg · h) for [5,5,5- 2 H $_3$]leucine] and then 2 μ mol/(kg · h) for 8 h. Venous blood samples were withdrawn in EDTA tubes (Venoject, Paris, France) at 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 8.25, 9, 10, 24, and 26 h and were immediately centrifuged (at 4°C, 2124g for 10 min). Sodium azide (inhibitor of bacterial growth) and a protease inhibitor [4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Pefabloc; Interchim, Montluçon, France] were added to plasma samples that were stored at -80°C until further analysis.

Isolation of lipoproteins and measurement of leucine enrichment in apoB100 have previously been described (Bailhache et al., 2004). In brief, VLDL was prepared by standard ultracentrifugation methods at 40,000 rpm for 22 h at 4°C. LDL was precipitated from the infranatant by heparin manganese chloride. VLDL and LDL-apoB100 were then isolated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. ApoB100 bands were dried under a vacuum and then hydrolyzed. The amino acids were purified by cation-exchange chromatography and then esterified and derivatized. Electron-impact gas chromatography/mass spectrometry was performed on a 5891A gas chromatograph connected with a 5971A quadrupole mass spectrometer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). The isotopic ratio was determined by selected ion monitoring at *m/z* of 282 and 285. Calculations of apoB100 kinetic parameters were based on the tracer/tracee mass ratio (Cobelli et al., 1992).

Modeling. Tracer/tracee ratios of apoB100 leucine in VLDL were analyzed by multicompartmental modeling. The SAAM II program (version 1.0.1; Resource Facility for Kinetic Analysis, Department of Bioengineering, SAAM Institute, Seattle, WA) was used to fit the model to the observed tracer data by a weighed least-squares approach to find the best fit as previously described (Maugeais et al., 2001; Bailhache et al., 2004) and to determine the parameters of the model. In brief, as described previously (Maugeais et al., 2001; Bailhache et al., 2004), such approach started with the simplest model based on minimal assumptions (i.e., apoB100 enters plasma through secretion of VLDL, which is then converted into LDL by triglyceride lipolysis, which would represent lipoprotein lipase activity). The complexity of the model was then progressively increased by including more known or credible physiological details until the optimal complexity was reached. As in most dogs, experimental data fit satisfactorily using the simplest two-compartment model (Fig. 1); it was not necessary to introduce more complexity as VLDL or LDL heterogeneity. Therefore, the used model, taking into account the absence of intermediate density lipoprotein in dogs (Bailhache et al., 2003a), corresponded to the typically known lipoprotein metabolism scheme, including liver secretion of apoB100 in VLDL followed by direct conversion to LDL, which is then removed from plasma by tissue-specific uptake. To better fit our experimental data, a credible physiological process was introduced corresponding to direct VLDL removal. Testing more complex models did not provide significant improvement in the fitting from F test and Akaike information

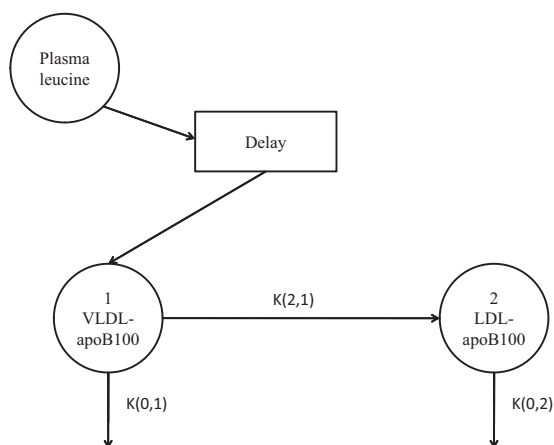


Fig. 1. Multicompartmental model of apoB100 metabolism in dogs. Precursor pool was represented by plasma-free leucine tracer/tracee ratios as forcing function. Compartment 1, VLDL-apoB100; compartment 2, LDL-apoB100; $k(0,1)$, VLDL direct removal; $k(2,1)$, VLDL conversion rate into LDL; $k(0,2)$, LDL removal.

criterion (Pont et al., 2002). Tracer/tracee ratio of plasma-free leucine was used as a forcing function describing the synthesis of apoB100. Compartment 1 represents VLDL-apoB100, and compartment 2 represents LDL-apoB100. VLDL-apoB100 is converted into LDL-apoB100. Parameters of VLDL direct removal, conversion into LDL, and LDL removal were, respectively, $k(0,1)$, $k(2,1)$, and $k(0,2)$. The sum of $k(0,1)$ and $k(2,1)$ represents VLDL fractional catabolic rate (FCR), and $k(0,2)$ represents LDL FCR. The apoB100 absolute production rate (APR) of VLDL and LDL, in milligrams per kilograms per hour, was calculated as the product of FCR by the pool size of apoB100, respectively, in these lipoprotein fractions. Plasma volume was estimated as 4.5% of BW.

Measurements of Lipids and apoB100 Plasma Concentration

Lipoproteins were separated as previously described (Bailhache et al., 2003a) by fast protein liquid chromatography system (Pharmacia Biotech, Orsay, France). Plasma VLDL and LDL fractions were subsequently analyzed for TG and total cholesterol (TC) using enzymatic methods (Triglycérides enzymatiques PAP 150 and Cholesterol RTU; BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Plasma NEFA concentration was measured by enzymatic method (Wako NEFA C; Oxoid, Dardilly, France) before the study and at the end of the 4 weeks of NA treatment. Evolution of NEFA plasma concentration was also determined during the 26 h of the kinetic studies.

For measurement of VLDL and LDL-apoB100 concentrations, the apoB100 was isolated from VLDL and LDL by preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using standards of known molecular weight. The band of apoB100 was then excised from the stained gel. Constant amount of norleucine (46 nmol) was added to a band of apoB100, and the same procedure for hydrolysis, cation exchange chromatography, and derivatization (as described above) was undertaken. In mass spectrometry, the ratio of leucine ion abundance to norleucine ion abundance was used to determine the quantity of leucine in the sample by comparison with a standard curve containing different amounts of leucine (0–200 μmol) and a constant amount of norleucine (6 μmol). The corresponding amount of apoB100 was then calculated according to the number of leucine molecules per apoB100 (Yao and McLeod, 1994).

Reverse Transcription and Real-Time Polymerase Chain Reaction

Liver and adipose tissue biopsies were obtained under anesthesia after 24-h food deprivation both before and at the end of the 4-week treatment. Approximately 100 mg of tissue was cleaned in saline.

TABLE 1

Sense/antisense primers used for DGAT2, MTP, HL, LPL, and glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) relative quantification

Gene	Primers Sense/Antisense
DGAT2	5'-AGTGGCTCAGGTTAGA-3' 5'-GACTCAAGCTGGAGCATTCC-3'
MTP	5'-AAGCTCTGGAACCACCAATG-3' 5'-GGAAATTCGTCCGAAAAGCA-3'
HL	5'-GCTGAGCCATTGGAAGAAG-3' 5'-AGCCACACTGCTGTAACGTG-3'
LPL	5'-ACAGTCAAGGCTGAGAACGG-3' 5'-CCACAACATACTCAGCACCAGC-3'
GAPDH	5'-ACAGTCAAGGCTGAGAACGG-3' 5'-CCACAACATACTCAGCACCAGC-3'

TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the tissue was immediately frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted from frozen tissue using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was quantified by spectrophotometric absorbance at 260 nm.

Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed in a 20- μl reaction volume using random primers (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and superscript II reverse transcriptase (according to the manufacturer's instructions; Invitrogen). Real-time polymerase chain reaction analysis was performed on the 7000 Sequence Detection System with SYBR Green Polymerase Chain Reaction Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers used for DGAT2, microsomal triglyceride transfer protein (MTP), hepatic lipase (HL), lipoprotein lipase (LPL), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase are listed in Table 1. Expression levels were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as housekeeping gene.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. The statistical analysis was performed by StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC) using the Wilcoxon test owing to the small size of our groups, which did not permit assurance of normal distribution of the data. A p value < 0.05 was considered significant. The analyses of NEFA kinetics and plasma lipid parameters have been performed by an analysis of variance for repeated measures using a linear mixed-effects model (Splus software version 6.2; TIBCO Software Inc., Somerville, MA).

Results

Insulin Sensitivity. The overfeeding of the dogs led to an increase in BW (+45%) and to the establishment of IR, highlighted by the decrease in I_{IS} (–69%) (data not shown). NA treatment decreased significantly the I_{IS} by 36% ($p < 0.05$) (Table 2). I_{IS} was unchanged in the obese group between weeks 0 and 4.

Lipid Parameters. Lipid parameter data are summarized in Table 2. Plasma TG was reduced by 31% with NA treatment (0.97 ± 0.11 to 0.67 ± 0.09 mM; $p < 0.001$) as VLDL-TG (from 0.18 ± 0.03 to 0.10 ± 0.02 mM; $p < 0.05$). TC was also reduced by 27% (4.60 ± 0.19 to 3.38 ± 0.15 mM; $p < 0.0001$) as LDL cholesterol by 43% (0.46 ± 0.06 to 0.26 ± 0.05 mM; $p < 0.05$).

At basal state, related to fasting, plasma NEFA concentration increased slowly during the 26 h of the kinetic study (Fig. 2). In the obese + NA group, we observed a significant decrease in plasma NEFA levels during the 2 h after the drug administration. This decrease was followed by a significant increase ($\times 2$) in NEFA concentration between 2 and 3 h. Finally, NEFA concentration decreased slowly to return to a

TABLE 2

BW, I_{IS} , fasting plasma insulinemia, glycemia, TG, TC, NEFA, VLDL-TG, and LDL cholesterol in obese and obese + NA dogs, at basal state (week 0) and at the end of the 4-week NA treatment

Values are presented as mean \pm S.E.M.

	Obese ($n = 3$)		Obese + NA ($n = 6$)	
	Week 0	Week 4	Week 0	Week 4
BW (kg)	15.38 \pm 1.62	15.00 \pm 1.53	16.8 \pm 0.7	16.3 \pm 0.6
I_{IS}	0.14 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01*
Insulinemia (μ U/ml)	20.3 \pm 1.2	16.7 \pm 1.2	16.20 \pm 3.12	14.80 \pm 1.02
Glycemia (g/l)	0.92 \pm 0.02	0.90 \pm 0.01	0.89 \pm 0.01	0.91 \pm 0.01
TG (mM)	0.87 \pm 0.05	0.87 \pm 0.08	0.97 \pm 0.11	0.67 \pm 0.09**
TC (mM)	4.80 \pm 0.15	4.55 \pm 0.29	4.60 \pm 0.19	3.38 \pm 0.15***
NEFA (mM)	0.87 \pm 0.12	0.90 \pm 0.06	0.86 \pm 0.10	1.01 \pm 0.09
VLDL-TG (mM)	0.09 \pm 0.04	0.10 \pm 0.04	0.18 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02*
LDL cholesterol (mM)	0.31 \pm 0.04	0.29 \pm 0.07	0.46 \pm 0.06	0.26 \pm 0.05*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$ vs. basal state for obese + NA.

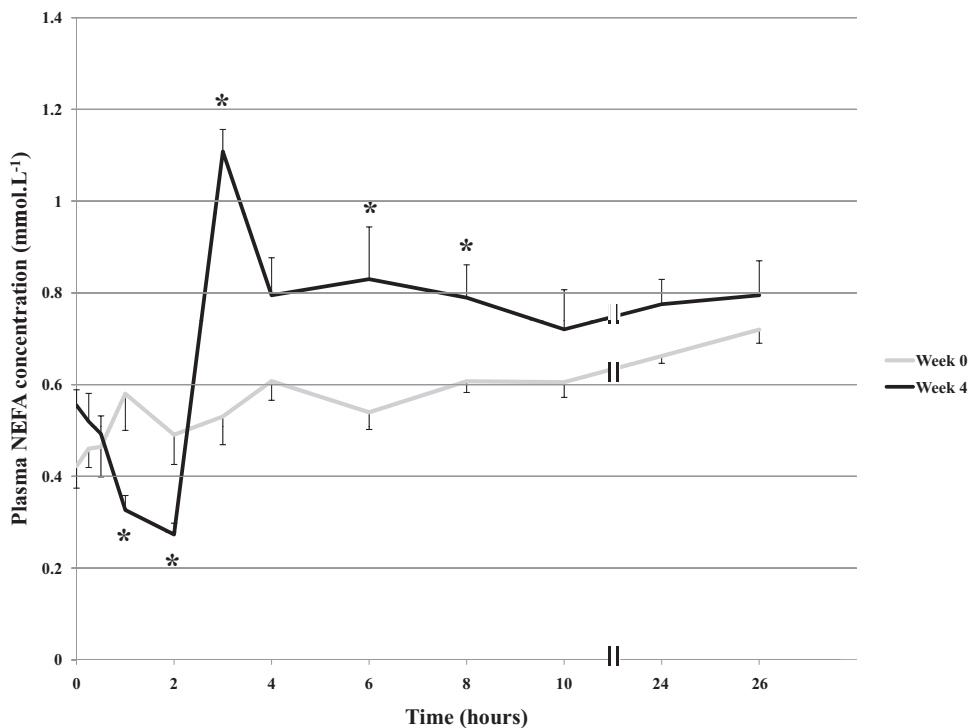


Fig. 2. Time course kinetics of NEFA plasma concentrations (mM), before (week 0, in gray) and after the 4 weeks of NA treatment (week 4, in black). Values are presented as the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ week 0 versus week 4.

TABLE 3

VLDL-apoB100, LDL-apoB100 plasma concentration, and kinetic parameters of VLDL and LDL in obese + NA dogs at basal state (week 0) and at the end of the 4-week NA treatment, obtained after multicompartmental analysis (see Fig. 1)

Values are presented as mean \pm S.E.M.

	Obese ($n = 3$)		Obese + NA ($n = 6$)	
	Week 0	Week 4	Week 0	Week 4
VLDL-apoB100 (mg/ml)	0.0103 \pm 0.0014	0.0250 \pm 0.0135	0.0098 \pm 0.0013	0.0057 \pm 0.00*
LDL-apoB100 (mg/ml)	0.065 \pm 0.005	0.060 \pm 0.005	0.080 \pm 0.011	0.038 \pm 0.003**
VLDL APR (mg/kg/h)	0.98 \pm 0.13	1.05 \pm 0.25	1.33 \pm 0.24	0.59 \pm 0.16*
VLDL conversion rate (h^{-1})	1.70 \pm 0.45	1.32 \pm 0.20	1.26 \pm 0.47	0.59 \pm 0.10
VLDL direct removal (h^{-1})	1.34 \pm 0.28	1.32 \pm 0.20	1.74 \pm 0.48	1.56 \pm 0.41
VLDL FCR (h^{-1})	2.38 \pm 0.41	2.59 \pm 0.29	3.01 \pm 0.41	2.16 \pm 0.42**
LDL FCR (h^{-1})	0.27 \pm 0.09	0.19 \pm 0.01	0.13 \pm 0.03	0.087 \pm 0.020
LDL APR (mg/kg/h)	0.56 \pm 0.08	0.51 \pm 0.07	0.49 \pm 0.16	0.15 \pm 0.03**

* $p < 0.001$ and ** $p < 0.05$ vs. basal state for obese + NA.

normal level. Statistical analysis showed differences at 1, 2, 3, and 6 h ($p = 0.0004$, $p = 0.017$, $p < 0.0001$, and $p = 0.0098$, respectively). NA treatment had no effect on glycemia or insulinemia. All these parameters did not significantly change in the obese group between weeks 0 and 4.

ApoB100 Kinetic Studies. ApoB100 concentrations and kinetics parameters are shown in Table 3. NA treatment decreased VLDL-apoB100 concentration (0.0098 ± 0.0013 to 0.0057 ± 0.0009 mg/ml; $p < 0.001$) and LDL-apoB100 concentration (0.080 ± 0.011 to 0.038 ± 0.003 mg/ml; $p < 0.05$).

VLDL-apoB100 APR was lower at the end of the NA treatment (from 1.33 ± 0.24 to 0.59 ± 0.16 mg/kg/h; $p < 0.001$). The conversion rate of VLDL to LDL, as well as the VLDL direct removal rate, did not significantly change, but the overall VLDL-apoB100 FCR significantly decreased (3.01 ± 0.41 to $2.16 \pm 0.42/h^{-1}$; $p < 0.05$). Finally, LDL-apoB100 was significantly decreased by NA treatment related to a significant decrease in LDL APR (0.49 ± 0.16 to 0.15 ± 0.03 mg/kg/h; $p < 0.05$), whereas LDL FCR did not change. All the kinetic parameters did not significantly change in the obese group between weeks 0 and 4.

Gene Expression. Compared with baseline, hepatic expression of DGAT2 was decreased approximately by $60 \pm 8\%$ ($p < 0.05$) (Fig. 3). The hepatic mRNA expression of MTP and HL was unchanged by the 4 weeks of NA treatment as LPL expression in adipose tissue. We did not observe any significant change in mRNA expression measurement in the obese group between weeks 0 and 4.

Discussion

In this study, NA treatment improves dyslipidemia in obese IR dogs by reducing plasma TG, TC, VLDL-TG, LDL cholesterol, and apoB100-containing lipoprotein concentrations. These changes were essentially explained by a decrease in VLDL production. The reduction of DGAT2 expression in liver could suggest a direct effect of NA on TG synthesis.

Dogs are known to show a large variability in plasma cholesterol and TG (Wolfgang et al., 1995; Bailhache et al., 2004). The three dogs enrolled in this study showed different

lipid concentrations. Taking into account this small number of dogs, the statistical analysis with an analysis of variance for repeated measures, using a linear mixed-effects model, has shown no significant difference among them, and, moreover, no significant difference in all the studied parameters between the beginning and the end of study.

Kinetic parameters obtained in obese IR dogs before treatment are in the same range compared with that we have previously obtained in similar pathological conditions, taking into account large variability in this species (Briand et al., 2008). Given the animal size, the dog is well adapted to metabolic studies (i.e., kinetic studies and IR assessment). In fact, our previous studies (Bailhache et al., 2003a) have shown that obesity in dog yields IR and dyslipidemia characterized by an increase in plasma TG and VLDL concentration and by a decrease in HDL cholesterol as in humans. Compared with these previous studies, we observed that NA improved dyslipidemia but was unable to completely normalize all the parameters.

In our study, we have shown a decrease in insulin sensitivity after 4 weeks of NA treatment. Data from several studies suggest that niacin-induced IR (increase in plasma glucose and insulin concentrations) dissipates by 16 weeks of therapy (Wang et al., 2000; Grundy et al., 2002; Vega et al., 2005), and further studies would be needed to confirm whether such inconvenience could be adequately controlled by adjusting the concomitant antidiabetic pharmacotherapy.

NA has been reported as a powerful lipid-lowering agent, which can lower TG, TC, and LDL cholesterol and increase HDL cholesterol in humans (Kabir et al., 2005), leading to a

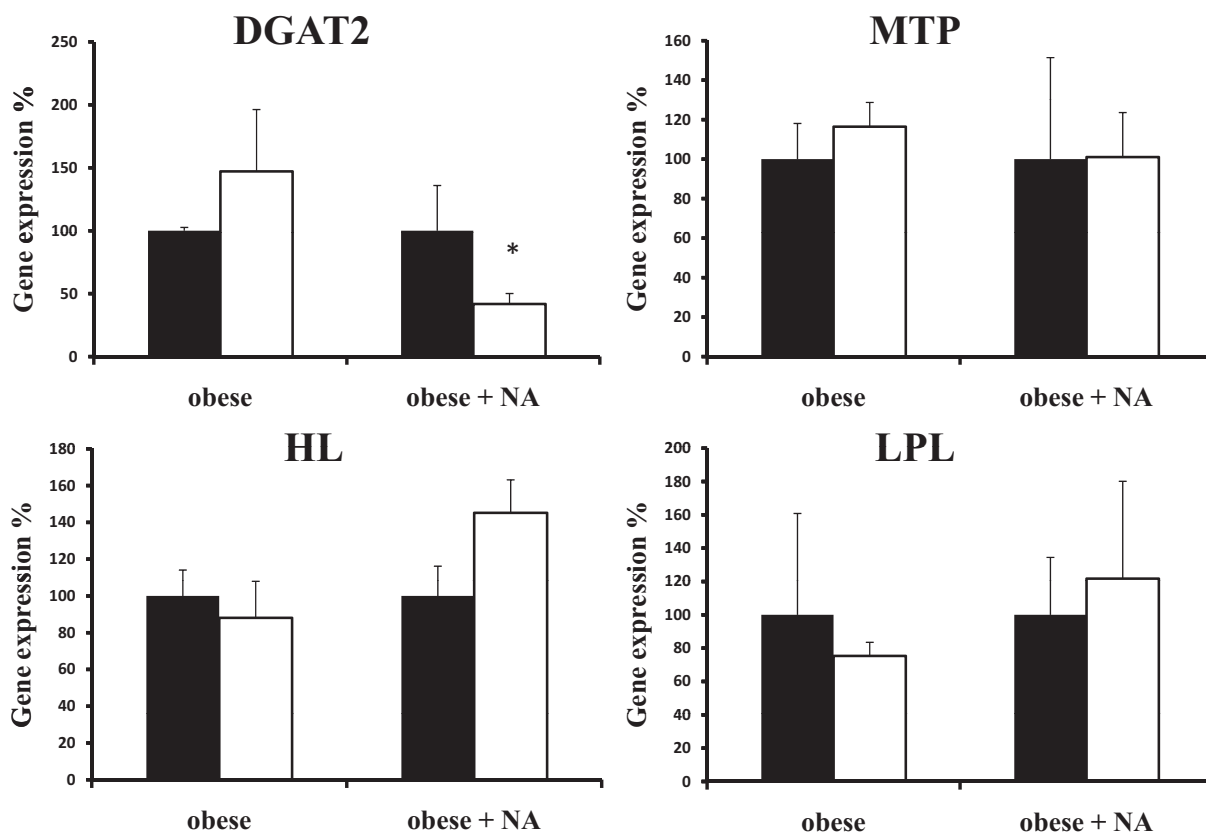


Fig. 3. Relative expression of DGAT2, MTP, and HL mRNA in liver and LPL mRNA in adipose tissue before (week 0, in black) and after the 4 weeks of NA treatment (week 4, in white). Values are presented as the mean \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ versus baseline.

significant reduction of cardiovascular risk (Taylor et al., 2004; Brown and Zhao, 2008). Doses used in this study are in the same range with those typically used in clinics [30 mg/(kg · day), approximately 2 g/day for a 70-kg human]. The effects of NA on lipid parameters observed were of the same order of magnitude as those previously described in humans (Meyers and Kashyap, 2004). These NA effects have been proposed to be related to a reduction of the NEFA release from adipose tissue by an inhibition of the hormone-sensitive lipase via the G protein-coupled receptor GPR109A (Gille et al., 2008), leading to a decreased flux of NEFA to the liver that consequently led to a lower TG synthesis. After acute administration of NA, we observed during 2 h a significant decrease in NEFA plasma level, which was followed, as soon as the second hour, by a rebound of NEFA concentration as described previously (Wang et al., 2001; Dhalla et al., 2007). The mechanism of NEFA rebound with NA remains unknown. It has been suggested that its magnitude depends on the decrease in NEFA (Blackard and Heidingsfelder, 1969). However, even if an implication of the parasympathetic system has been mentioned, literature did not provide any experimental data to support such hypotheses. Taking together, these observations emphasize that the reduction of the NEFA flux to the liver could not be the main explanation of the effect of NA on plasma TG. Consequently, NA should reduce TG by modulating other molecular target(s). Using pharmacological doses of NA, an inhibition of TG synthesis (Jin et al., 1999) related to an inhibition of DGAT2 activity (Ganji et al., 2004) has previously been shown on cultured cells. Moreover, a reduced VLDL-TG secretion has been recently shown in humans treated with NA (Fabbrini et al., 2010). In the present study, we showed for the first time in vivo that, with a dose similar to human treatment, NA lowered the DGAT2 expression with no change in NEFA availability from adipose tissue. This inhibition could lead to a lowered TG synthesis and, therefore, to lower VLDL-apoB100 production as shown in vitro (Jin et al., 1999) and recently in humans (Fabbrini et al., 2010). Moreover, the unchanged MTP expression confirmed that NA would directly act on TG synthesis rather than on VLDL assembly. Furthermore, inhibition of DGAT2 with antisense oligonucleotides has been shown to improve some components of metabolic syndrome such as IR, hepatic steatosis, or TG secretion (Choi et al., 2007). Even if we did not measure the protein activity or level, these findings support the interesting potency of DGAT2 inhibition for lowering triglyceridemia, but further studies would be needed to determine the actual implication of DGAT2. Because DGTA1, another isoform, has been shown as an effective target in hypertriglyceridemia (Zammit et al., 2008), we suppose that the synthesis of DGAT2 inhibitors derived from NA could be a useful research area to develop new additional drugs to treat hypertriglyceridemia and potentially other disturbances of metabolic syndrome.

Our kinetic data did not show any modification of the VLDL conversion rate that is in accordance with the expression measurement of LPL and HL. However, our data are inconsistent with those of Lamon-Fava et al. (2008), who showed a trend for an increase in VLDL catabolism without any change in production. The discrepancy with our results could be explained by differences in the characteristics of the studied dyslipidemia. In the study of

Lamon-Fava et al. (2008), subjects had combined hyperlipidemia, whereas in our study, dogs were hypertriglyceridemic but normocholesterolemic. Another explanation is that our kinetic study was conducted in fasting state, whereas that of Lamon-Fava et al. (2008) was undertaken in feeding state, leading to higher triglyceridemia in their experiments that could have had an influence on apoB100 production and catabolism. Finally, the treatment drug was not taken at the same time that we administered NA, just before the beginning the tracer infusion; rather, it was given the previous evening in the other study. The study design of Lamon-Fava et al. (2008) and ours was different, and the comparison of the results is questionable.

In the present study, we also observed a decrease in LDL-apoB100 level that was related to a reduced production. Because the VLDL conversion rate did not change significantly, the lower LDL production was explained by the decrease in VLDL concentration and then could be only a consequence of the decrease in VLDL production.

In conclusion, this study reports for the first time both the effect of NA in vivo on apoB100 containing lipoprotein metabolism and key gene expression. We showed that in fasting obese IR dogs, NA decreased plasma TG by reducing VLDL production in accordance with the reduction in DGAT2 expression. In this species, although characterized by a low level of LDL, NA decreases LDL level by reducing LDL production rate as a consequence of reduced VLDL production. The effect on NA on DGAT2 gene expression and hepatic VLDL production deserves further study.

Acknowledgments

We thank Samuel Ninet, Nadia Guignard, Stéphanie Crossouard, and Philippe Bleis for taking care of the animals and technical assistance.

References

- Bailhache E, Briand F, Nguyen P, Krempf M, Magot T, and Ouguerram K (2004) Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* **34**: 527–534.
- Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, and Ouguerram K (2003a) Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* **52**:559–564.
- Bailhache E, Ouguerram K, Gayet C, Krempf M, Siliart B, Magot T, and Nguyen P (2003b) 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**:86–95.
- Blackard WG and Heidingsfelder SA (1969) Effect of adrenergic receptor blockade on nicotinic acid-induced plasma FFA rebound. *Metabolism* **18**:226–233.
- Briand F, Bailhache E, Andre A, Magot T, Krempf M, Nguyen P, and Ouguerram K (2008) The hyperenergetic-fed obese dog, a model of disturbance of apolipoprotein B-100 metabolism associated with insulin resistance: kinetic study using stable isotopes. *Metabolism* **57**:966–972.
- Brown BG and Zhao XQ (2008) Nicotinic acid, alone and in combinations, for reduction of cardiovascular risk. *Am J Cardiol* **101**:58B–62B.
- Bruce KD and Hanson MA (2010) The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr* **140**:648–652.
- Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K, Kim S, Distefano A, Samuel VT, Neschen S, et al. (2007) Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem* **282**:22678–22688.
- Cobelli C, Toffolo G, and Foster DM (1992) Tracer-to-tracee ratio for analysis of stable isotope tracer data: link with radioactive kinetic formalism. *Am J Physiol* **262**:E968–E975.
- Dhalla AK, Santikul M, Smith M, Wong MY, Shryock JC, and Belardinelli L (2007) Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther* **321**:327–333.
- Duvillard L, Pont F, Florentin E, Galland-Jos C, Gambert P, and Vergès B (2000) Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest* **30**:685–694.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Korenblat KM, Magkos F, McCrea J, Patterson BW, and

- Klein S (2010) Effect of fenofibrate and niacin on intrahepatic triglyceride content, very low-density lipoproteins kinetics, and insulin action in obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:2727–2735.
- Ganji SH, Tavintharan S, Zhu D, Xing Y, Kamanna VS, and Kashyap ML (2004) Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J Lipid Res* **45**:1835–1845.
- Gille A, Bodor ET, Ahmed K, and Offermanns S (2008) Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:79–106.
- Goldberg A, Alagona P Jr, Capuzzi DM, Guyton J, Morgan JM, Rodgers J, Sachson R, and Samuel P (2000) Multiple-dose efficacy and safety of an extended-release form of niacin in the management of hyperlipidemia. *Am J Cardiol* **85**:1100–1105.
- Grundy SM, Vega GL, McGovern ME, Tulloch BR, Kendall DM, Fitz-Patrick D, Ganda OP, Rosenson RS, Buse JB, Robertson DD, et al. (2002) Efficacy, safety, and tolerability of once-daily niacin for the treatment of dyslipidemia associated with type 2 diabetes: results of the assessment of diabetes control and evaluation of the efficacy of niacin trial. *Arch Intern Med* **162**:1568–1576.
- Jin FY, Kamanna VS, and Kashyap ML (1999) Niacin accelerates intracellular ApoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:1051–1059.
- Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S, Kim SP, Van Citters GW, Dea MK, and Bergman RN (2005) Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**:E454–E461.
- Kamanna VS and Kashyap ML (2008) Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol* **101**:20B–26B.
- Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Barrett PH, Buchsbaum A, Nyaku M, Horvath KV, Asztalos BF, Otokozawa S, Ai M, Matthan NR, et al. (2008) Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:1672–1678.
- Maugeais C, Ouguerram K, Frénaïs R, Maugère P, Charbonnel B, Magot T, and Krempf M (2001) Effect of low-density lipoprotein apheresis on kinetics of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1679–1686.
- Meyers CD and Kashyap ML (2004) Management of the metabolic syndrome-nicotinic acid. *Endocrinol Metab Clin North Am* **33**:557–575.
- Ouguerram K, Magot T, Zaïr Y, Marchini JS, Charbonnel B, Laouenan H, and Krempf M (2003) Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:332–337.
- Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Baillache E, and Magot T (2004) 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* **138**:339–345.
- Pont F, Duvillard L, Florentin E, Gambert P, and Vergès B (2002) Early kinetic abnormalities of apoB-containing lipoproteins in insulin-resistant women with abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:1726–1732.
- Radziuk J (2000) Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:4426–4433.
- Serisier S, Gayet C, Leray V, Le Bloc'h J, Ouguerram K, Magot T, and Nguyen P (2008) Hypertriglyceridaemic insulin-resistant obese dog model: effects of high-fat diet depending on age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**:419–425.
- Svedmyr N, Harthorn L, and Lundholm L (1969) The relationship between the plasma concentration of free nicotinic acid and some of its pharmacologic effects in man. *Clin Pharmacol Ther* **10**:559–570.
- Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, and Grace KA (2004) Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation* **110**:3512–3517.
- Tenenbaum A, Fisman EZ, Motro M, and Adler Y (2006) Atherogenic dyslipidemia in metabolic syndrome and type 2 diabetes: therapeutic options beyond statins. *Cardiovasc Diabetol* **5**:20.
- Vega GL, Cater NB, Meguro S, and Grundy SM (2005) Influence of extended-release nicotinic acid on nonesterified fatty acid flux in the metabolic syndrome with atherogenic dyslipidemia. *Am J Cardiol* **95**:1309–1313.
- Wang W, Basinger A, Neese RA, Christiansen M, and Hellerstein MK (2000) Effects of nicotinic acid on fatty acid kinetics, fuel selection, and pathways of glucose production in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**:E50–59.
- Wang W, Basinger A, Neese RA, Shane B, Myong SA, Christiansen M, and Hellerstein MK (2001) Effect of nicotinic acid administration on hepatic very low density lipoprotein-triglyceride production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**:E540–E547.
- Wolfgang GH, Robertson DG, Welty DF, and Metz AL (1995) Hepatic and adrenal toxicity of a novel lipid regulator in beagle dogs. *Fundam Appl Toxicol* **26**:272–281.
- Yao Z and McLeod RS (1994) Synthesis and secretion of hepatic apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1212**:152–166.
- Zammit VA, Buckett LK, Turnbull AV, Wure H, and Proven A (2008) Diacylglycerol acyltransferases: Potential roles as pharmacological targets. *Pharmacol Ther* **118**:295–302.

Address correspondence to: Khadija Ouguerram, IRTUN L'Institut du Thorax-UMR 915, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1, France. E-mail: khadija.ouguerram@univ-nantes.fr

IV.3 Discussion

L'AN est un puissant agent pharmaceutique hypotriglycéridémiant mais l'existence d'effets secondaires importants a limité son utilisation. Parmi ces effets secondaires, une aggravation de l'insulinorésistance a été décrite (Kelly et al., 2000, Poynten et al., 2003). Cette diminution de la sensibilité à l'insuline, mesurée également lors de notre étude, pourrait limiter la prescription d'AN à des patients atteints de syndrome métabolique. Cependant, on a montré une normalisation de la sensibilité à l'insuline après une longue période de traitement (16 semaines) (Grundy et al., 2002, Vega et al., 2005), suggérant qu'un traitement à l'AN est possible pour des patients insulinorésistants ou diabétiques. De nouvelles études sont cependant nécessaires afin de confirmer la possibilité de contrôler de tels inconvénients chez l'homme, notamment en adaptant les traitements antidiabétiques.

Bien que les effets hypolipidémiant de l'AN soient bien documentés, les mécanismes conduisant à l'amélioration de la dyslipidémie ne sont pas clairement établis. Nous montrons chez le chien une réduction des concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol et LDL-cholestérol, et ce à un niveau similaire à celui observé chez l'homme (Carlson, 2005). Nous montrons également une réduction de l'apoB100 des VLDL, principalement due à une réduction de la production malgré une tendance à la réduction du catabolisme. Il est donc possible que la production des VLDL est été réduite suite au traitement. Ces observations sont en accord avec la diminution de la production de triglycérides observée *in vitro* (Jin et al., 1999) et *in vivo* (Fabbrini et al., 2010), qui entraînerait une baisse de la production de VLDL. Nous observons également une diminution de la concentration de LDL-*apoB100*, expliquée par une réduction de leur production, secondaire à la réduction des VLDL.

Afin de proposer un ou des mécanismes d'action de l'AN qui pourrait expliquer la réduction de la triglycéridémie, nous avons mesuré la concentration en AGNE tout au long des 24h que dure le protocole de marquage des apolipoprotéines. Nous observons une réduction de cette concentration dans les 2h suivant le début de la cinétique. Cette réduction précédemment décrite (Wang et al., 2000) a été expliquée par une inhibition de la lipase hormono-sensible. Cependant, l'augmentation importante de la concentration 3h après le début du protocole confirme les résultats d'études précédentes (Wang et al., 2000) et suggère que la lipase hormono-sensible n'est peut être pas la cible majeure de l'AN.

L'absence de changement dans l'expression de la MTP montre que la baisse de production des VLDL ne s'explique pas par une diminution de leur assemblage. Cependant, nous montrons une réduction de l'expression de la DGAT2 à l'issue du traitement. Dans la mesure où cette enzyme a été décrite comme l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des triglycérides, cette réduction de son expression doit être associée à une moindre production de triglycérides. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus *in vitro* (Ganji et al., 2004). Cependant, nous mettons en évidence cette réduction de la synthèse hépatique de triglycérides pour la 1^{ère} fois *in vivo*. Il est toutefois nécessaire de confirmer cette inhibition chez l'homme, en mesurant l'expression hépatique de DGAT2 mais également en étudiant le niveau de protéine et l'activité enzymatique. De plus, ces résultats confirment l'intérêt thérapeutique d'une inhibition de la DGAT2 dans le traitement de la dyslipidémie (Choi et al., 2007, Zammit et al., 2008).

V. Effets de l'acide nicotinique sur le transport inverse du cholestérol

V.1 Introduction

La caractéristique pharmacologique principale de l'AN est un accroissement de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol. En effet, une hausse de 15 à 35% de cette concentration est observée chez l'Homme, faisant de l'AN l'agent pharmacologique le plus efficace pour augmenter le HDL-cholestérol (Meyers and Kashyap, 2004). De plus, l'AN permet également d'accroître la concentration plasmatique en apoAI. Cependant, le ou les mécanismes conduisant à ces hausses ne sont pas clairement établis et les conséquences sur le transport inverse du cholestérol ne sont pas connues.

On a montré que l'AN était capable d'accroître l'expression de l'ABCA1 *in vitro* (Rubic *et al.*, 2004), et en parallèle, une stimulation de l'efflux du cholestérol a été décrite chez le lapin hypercholestérolémique traité à l'AN (Zhao *et al.*, 2008). Il semble donc qu'il existe un effet positif de l'AN sur l'efflux de cholestérol. A l'inverse, aucun changement de l'expression ou de l'activité du SR-BI n'a été mis en évidence (Nieland *et al.*, 2007), suggérant qu'aucune modification de la capture sélective des esters de cholestérol n'a lieu après un traitement à l'AN. Enfin, il semble que la CETP joue un rôle important dans la hausse du HDL-cholestérol observée. En effet, aucun changement de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol n'a été observé après traitement à l'acide nicotinique chez la souris, espèce dépourvue de CETP. Cependant, la surexpression de la CETP humaine chez ces souris permet une augmentation du HDL-cholestérol, soulignant toute l'importance de la CETP (Hernandez *et al.*, 2007).

En dehors de ces données partielles, les effets de l'AN sur la dynamique du transport inverse du cholestérol ne sont pas clairement déterminés. En effet, les quelques études cinétiques disponibles concernant l'apoAI fournissent des informations indirectes sur le transport inverse du cholestérol mais apportent des résultats contradictoires. En effet, la 1^{ère} étude de ce type a montré un plus faible catabolisme de l'apoAI après un traitement à l'AN (Blum *et al.*, 1977). Par la suite, aucun effet de l'AN sur le métabolisme des HDL n'a pu être mis en évidence dans une étude menée chez des hommes sains (Shepherd *et al.*, 1979). Enfin, récemment, une plus forte

production de l'apoAI a été décrite après un traitement à l'AN chez des patients dyslipidémiques (Lamon-Fava *et al.*, 2008). Il faut toutefois noter que du fait de différences dans les caractéristiques physiologiques des sujets traités, les comparaisons entre ces études sont difficiles. L'utilisation de différentes formes d'AN (cristalline ou à libération prolongée) peut également limiter la comparaison des résultats obtenus. De plus, des modifications dynamiques du métabolisme du cholestérol secondaires à un traitement à l'AN n'ont jamais été étudiées à ce jour.

Dans le but d'étudier le transport inverse du cholestérol, le double marquage de l'apoAI et du cholestérol apparaît être l'une des meilleures méthodes disponibles. Cette méthode a été appliquée aux chiens traités à l'AN (375mg/jour pendant une semaine, puis 500 mg/jour pendant trois semaines) en perfusant simultanément de la ^2H -leucine pour marquer l'apoAI et du ^{13}C -acétate comme marqueur endogène du cholestérol. Après isolation des HDL par ultracentrifugation, l'apoAI a été purifiée par chromatographie puis l'enrichissement de l'apoAI en ^2H -leucine a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Parallèlement, le cholestérol (libre et estérifié) a été extrait des HDL et l'enrichissement de celui-ci en ^{13}C a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique. De plus, des mesures d'efflux de cholestérol *in vitro* ont été réalisées, ainsi que des mesures d'expression de gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol (SR-BI, ABCA1, chaîne β de l'*ATP synthase*).

V.2 Article 5

Nicotinic acid accelerates HDL cholesteryl ester turnover in obese insulin resistant dogs.

Jérôme Le Bloc'h, Véronique Leray, Hassan Nazih, Samuel Serisier, Muhammad-Quaid Zaman, Thierry Magot, Michel Krempf, Patrick Nguyen and Khadija Ouguerram.

Soumis à l'European Journal of Pharmacology

Nicotinic acid accelerates HDL cholesteryl ester turnover in obese insulin resistant dogs.

Jérôme LE BLOC'H, Véronique LERAY, Hassane NAZIH, Samuel SERISIER, Muhammad-Quaid ZAMAN, Thierry MAGOT, Michel KREMPF, Patrick NGUYEN and Khadija OUGUERRAM.

Human Nutrition Research Center, Nantes, France

1. INSERM U915, Nantes, F-44007, France (JLB, TM, MK, KO)
2. Nutrition and Endocrinology unit, Nantes-Atlantic National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, ONIRIS, Nantes, F-44307, France (JLB, VL, SS, MQZ, PN)
3. Sea Molecules Health laboratory, Nantes University, F-44035, France (HN)

RUNNING TITLE PAGE

Running head: Nicotinic acid and HDL cholesteryl ester turnover.

Recommended section: cardiovascular

Corresponding Author:

Khadija OUGUERRAM

L'institut du Thorax – UMR 915, Centre de Recherche en Nutrition Humaine-INSERM U915,
IRT, 8 quai Moncousu BP70721 44007 Nantes cedex 1, France.

Khadija.Ouguerram@univ-nantes.fr

Tel: 33 (0)2 28 08 01 73

Fax: 33 (0)2 28 08 01 30

Number of text pages: 15

Number of tables: 3

Number of figures: 2

Number of references: 40

Words in abstract: 240

Words in introduction: 611

Words in discussion: 1274

Abbreviations used: ABCA1, ATP binding cassette A1; apoAI, apolipoprotein A1, APR, absolute production rate; CE, cholesteryl ester; CETP, cholesteryl ester transfer protein; FCR, fractional catabolic rate; I_{IS}, insulin sensitivity index; LXR α , liver X receptor α ; NA, nicotinic acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RCT, reverse cholesterol transport; SR-BI, scavenger receptor class B type 1; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; UC, unesterified cholesterol

Summary

Nicotinic acid (NA) improves plasma lipids in man but the involved mechanisms are not fully understood. The cholesteryl ester transfer protein (CETP) appears to be potentially at the heart of the lipid-modulating effects of NA, notably by raising HDL-C as a result of a reduction in plasma triglycerides. In this study, we analyzed the effects of NA (375 mg.d⁻¹ for one week and then 500 mg.d⁻¹ for three weeks) on HDL cholesteryl ester (CE) turnover in dogs, a species devoid of CETP. HDL kinetics was assessed through endogenous labeling of both their cholesterol and apoAI moieties. The effectiveness of HDL to promote cellular cholesterol efflux was measured *in vitro*. Plasma total cholesterol was reduced ($p < 0.0001$) due to LDL-C ($p < 0.05$) and HDL-C ($p < 0.0001$) reduction. Triglycerides were also reduced ($p < 0.01$) related to VLDL-TG ($p < 0.05$) decrease. Kinetic study showed a higher cholesterol esterification activity (1.4 fold, $p < 0.05$) in accordance with an elevated cholesterol efflux ($p < 0.05$). HDL-CE turnover was accelerated (+110%, $p < 0.05$) via both HDL removal through endocytosis and CE selective uptake (twofold increase for both, $p < 0.05$). In obese insulin resistant dog, NA treatment reduced HDL-C by raising its fractional catabolic rate and promoted cholesterol efflux and esterification, probably leading to an improved reverse cholesterol transport. These results highlight CETP-independent effects of NA that could participate to the reduction in cardiovascular diseases observed with this drug.

Introduction

The lipid-lowering effects of nicotinic acid (NA) were first reported more than 50 years ago (Altschul *et al.*, 1955). In humans, pharmacological doses of NA lead to a reduction in triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and LDL cholesterol (LDL-C) plasma concentrations, and to an enhancement in HDL cholesterol (HDL-C). Epidemiological studies have shown that this improvement in lipid profile significantly lowers the risk of coronary heart disease (Canner *et al.*, 1986), potentially through an action on reverse cholesterol transport (RCT) secondary to the increase in HDL-C.

Despite these well-known effects, the underlying mechanisms are not fully understood. *In vitro* studies have reported that NA stimulates the expression of ATP binding cassette A1 (ABCA1) (Rubic *et al.*, 2004) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) (Knowles *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008), but has no effect on the expression of SR-BI in CHO cells stably transfected (Nieland *et al.*, 2007). In this later study, authors have also reported unchanged HDL-protein or HDL-cholesteryl ester (HDL-CE) selective uptake. An inhibition of the surface expression of ATP synthase β chain has also been shown in HepG2 cells treated by NA (Zhang *et al.*, 2008). This receptor potentially mediates HDL endocytosis (Martinez *et al.*, 2003), but its physiological importance has never been demonstrated. Finally, cholesteryl ester transfer protein (CETP) has been shown to be potentially at the heart of the NA-mediated HDL elevation. In mice, species devoid of CETP activity, NA did not affect HDL concentration, while the expression of human CETP in these mice led to a higher HDL-C level (Hernandez *et al.*, 2007), demonstrating that CETP is required for the NA-mediated HDL elevation. However, the effects of NA on HDL turn-over need to be more precisely studied.

To study HDL-C turnover, the labeling of both apoAI and CE has been shown to be a good approach of the HDL-dependent part of RCT. For kinetic approach, the HDL labeling has firstly

been made using radioactive compounds (Pittman et al., 1987; Ouguerram et al., 1996), and we have modified this method by using endogenous labeling with stable isotopes (Ouguerram *et al.*, 2004). Compared to previous methods, this one is safer and allows the direct assessment of cholesterol esterification rate by lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). In order to study the HDL-dependent part of RCT, the choice of the animal model is critical. As dog is lacking of CETP activity (Ouguerram et al., 2004), RCT in this species is only performed by a HDL-dependant pathway. Moreover, among species used to analyze cholesterol metabolism, dog exhibits the largest part of selective uptake in total HDL-CE turnover (Ouguerram *et al.*, 2004) compared to rat (Pittman et al., 1987; Ouguerram et al., 1996), mouse (Khoo *et al.*, 1995), and human (Ouguerram *et al.*, 2004). Then, dog appears to be a good model to study HDL metabolism, and notably the *in vivo* modulation of the CE selective uptake. Moreover, giving its large size, this species is well adapted for such metabolic study and allow us individual comparison. Finally, the obese and insulin resistant dog exhibit a dyslipidemia (higher TG and lower HDL-C plasma concentrations) that is classically observed in patients with metabolic syndrome, and that is partly corrected by NA (Goldberg *et al.*, 2000).

The aim of this study was to examine the effects of NA on HDL turnover in obese insulin resistant dogs, CETP lacking species. The present study used a dual stable isotope approach to assess HDL kinetics through endogenous labeling of both their cholesterol and apoAI moieties. The interest of such a protocol, besides the measurement of *in vivo* efflux of cholesterol, is to quantify the part of cholesterol removed by either HDL endocytosis or selective CE uptake.

Materials and methods

Animals and treatment

Nine obese and insulin resistant beagle dogs, males (aged 1.8 ± 0.1 y) with a mean body weight (BW) of 16.8 ± 0.7 kg ($23.7 \pm 2.4\%$ fat mass) were used in this study. They were fed once daily with a high-fat (32% protein, 20% fat, 4.3 kcal.g⁻¹), dry (extruded) commercial diet (Medium Junior, Royal Canin, Aimargues, France). The energy allocation was 1.6 times the National Research Council (NRC) recommendation. Water was constantly available. Dogs were housed individually at the National College of Veterinary Medicine of Nantes. Experimental protocols adhered to European Union guidelines and were approved by the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Nantes.

Six dogs were given 375 mg.d⁻¹ of NA extended-release (Niaspan®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) for one week (23.2 ± 1.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹) and then 500 mg.d⁻¹ for 3 weeks (30.9 ± 1.5 mg.kg⁻¹.d⁻¹), that corresponds to a standard treatment in humans (around 2 g.d⁻¹, i.e. 29 mg.kg⁻¹.d⁻¹). NA was administered orally each day before the meal. Dogs have been monitored by an independent veterinarian and no side effects appeared during the study. To exclude drug-independent time effect, 3 dogs were used as controls for clinical and biochemical measurements, including insulin sensitivity evaluation, gene expression and cholesterol efflux measurements.

Euglycemic-hyperinsulinemic clamp

A 3-h euglycemic-hyperinsulinemic clamp was conducted in 24-h food-deprived dogs to determine *in vivo* insulin sensitivity, as previously described (Bailhache *et al.*, 2003b). Briefly, human insulin (Actrapid; NovoNordisk, Bagsvaerd, Denmark) was infused (via a catheter placed in a cephalic vein) to induce hyperinsulinemia (4 mU.kg⁻¹ for 1 min and 2 mU.kg⁻¹.min⁻¹ for the duration of the experiment). Glucose (Glucose 20%; Laboratoire Aguetant, Lyon, France) was

clamped at basal level by adjustment of the glucose infusion rate in the cephalic vein. Blood samples were drawn from a jugular catheter every 5 min from 0 to 60 min and every 10 min from 60 to 180 min. These samples were placed in ice-cold heparinized tubes and centrifuged at 4°C, 2724 g for 10 min and stored at -80°C for further insulin analysis. Rapid determination of blood glucose during clamping was achieved using the glucose oxidase method (Glucotrend® Plus; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma insulin concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay kit (RIA Insik-5; Diasorin, Saluggia, Italy). In accordance with Radzuik et al. (2000), insulin sensitivity index (I_{IS}) was defined as the mean glucose infusion rate (mg/kg/min) divided by the mean plasma insulin concentration ($\mu\text{U/mL}$) of the last 60 min of the clamp. One dog could not be studied because of technical problems.

Plasma lipid and lipoprotein analysis

Jugular vein blood samples were collected into EDTA, following 24-h food-deprivation, and then immediately centrifuged (at 4°C, 2724g for 10 min) and stored (-80°C) for further analysis. Lipoproteins were separated as previously described (Bailhache *et al.*, 2003a) by fast-protein liquid chromatography (FPLC) system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) and TG and TC were measured in each fractions. TG, TC, unesterified cholesterol (UC) and non esterified fatty acids (NEFA) were assessed using enzymatic methods (Cholesterol RTU, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France; Triglycerides enzymatique TG PAP150, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France ; Free cholesterol FS, Diasys, Germany ; NEFA C, WAKO, Oxoid, Dardilly, France). CE concentration was measured as TC concentration minus UC concentration.

***In vivo* HDL CE and apolipoprotein kinetics**

Kinetic studies were performed as previously described (Ouguerram *et al.*, 2004) using a 8-h constant infusion of [1,2 $^{13}\text{C}_2$] acetate and [5,5,5 $^2\text{H}_3$] leucine, as labeled precursors of CE and apoAI respectively. The kinetic experiments have been made only in the treated dogs. The last dose of NA was given the morning of the experiment. Venous blood samples were withdrawn in EDTA tubes (Venoject, Paris, France) at 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 8.25, 9, 10, 24 and 26 h. Sodium azide (inhibitor of bacterial growth), protease inhibitor (Pefabloc, Interchim, Montluçon, France) and 5,5-dithio-bis-nitro benzoate (DTNB), LCAT inhibitor, were added to plasma samples. HDL-apoAI and plasma leucine were analyzed for isotopic enrichment of leucine using gas chromatography coupled-mass spectrometry (GC-MS). Lipoproteins were separated by ultracentrifugation and apoAI from HDL was isolated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis as already described by Ouguerram *et al.* (2004). ApoAI bands were dried under a vacuum then hydrolyzed (HCL 4N, 110°C, 24h). The amino acids were purified by cation-exchange chromatography and then esterified and derivatized. Electron-impact GC-MS was performed on a 5891A gas chromatograph connected with a 5971A quadrupole mass spectrometer (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA). The isotopic ratio was determined by selected ion monitoring at m/z of 282 and 285.

Analysis of cholesterol and measurement of ^{13}C enrichments using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) were performed as previously described (Ouguerram *et al.*, 2004). Briefly, lipid extraction was performed with chloroform-methanol (2:1, v/v). UC and CE were separated by chromatography on silicic acid, using microcolumns (Sep Pack cartridges, Waters, Milford, MA, USA). Cholesterol samples were derivatized with a mixture of acetic anhydride (500 μl) and pyridine (100 μl). UC and CE ^{13}C enrichments were then measured by GC-C-IRMS.

Kinetic analysis was performed with SAAMII program (SAAM Institute, Seattle, WA, USA), as previously described in humans (Ouguerram *et al.*, 2002) and dogs (Ouguerram *et al.*, 2004). In this approach, the fate of HDL-CE was considered as double: i) simultaneous removal of CE and apoAI through HDL particle uptake and ii) selective CE uptake. To analyze apoAI labeling data, HDL-apoAI was considered as one-compartment model (Fig. 1A). Labeling input was done after a delay from plasma free leucine tracer-to-tracee ratio (as forcing function). In this model, k_{01} represented the parameter of HDL-apoAI endocytosis by tissues including liver. To analyze CE labeling data, HDL-CE was also considered as one-compartment model (Fig. 1B). Labeling input was done from UC enrichments (as forcing function) through cholesterol esterification k_{LCAT} . In this model k_{01} and k_{01}' represented the two CE output parameters, through HDL particle endocytosis by tissues including liver and hepatic CE selective uptake, respectively. Parameters were simultaneously identified from data of HDL-apoAI and CE. The protocol provided FCR of apoAI (k_{01} , apoAI catabolism) and selective uptake mediated CE turnover (k_{01}' , selective uptake). It provided also the rate constant of LCAT (k_{LCAT} , in h^{-1}), as proportion of plasma UC esterified per hour. The CE or apoAI production rate (PR) in $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ was the product of the FCR and the pool size of CE or apoAI in the HDL. Pools of CE and apoAI in HDL were calculated by multiplying the CE or apoAI concentration by $0.045 (L \cdot kg^{-1})$ assuming a plasma volume of 4.5% of body weight (Haneda and Horiuchi, 1986).

***In vitro* measurement of cholesterol efflux**

The ability of serum to efflux cell UC was measured by a procedure previously described (de la Llera Moya *et al.*, 1994; Ripolles Piquer *et al.*, 2006) using [3H]-cholesterol labeled Fu5AH. Briefly, Fu5AH cells were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM) (Sigma,

Saint-Quentin Fallavier, France) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Penicillin, streptomycin, and glutamine were present in all media.

For efflux experiments, cells were plated in costar 24-well plates and grown in appropriate medium containing 10% FCS at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. When they were nearly confluent, cells were incubated for 24 hours at 37°C with 1 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$ of [1,2-³H] cholesterol (10% FCS in EMEM). To ensure that the label was evenly distributed among cellular pools, the labeling medium was replaced with EMEM containing 1% BSA (Sigma), and cells were incubated in albumin for 18 to 20 hours before measuring cholesterol efflux. The cells were then washed and incubated with the indicated serum prepared in EMEM (5% [vol/vol]), and efflux was performed for 4 hours. After efflux period, media were collected and counted for radioactivity by liquid scintillation counting. The residual radioactivity in the cells was determined after extraction with isopropanol. The percent efflux was calculated by dividing the radioactivity counts in the media by the sum of the radioactivity counts in the media plus the cell fraction.

Hepatic mRNA expression

Liver biopsies were obtained twice under anesthesia, following 24-h food-deprivation before and at the end of the 4-weeks treatment. Approximately 100 mg of tissue was cleaned in saline. TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added and the tissue immediately frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted from frozen tissue using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was quantified by spectrophotometric absorbance at 260 nm.

Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed in a 20 μL reaction volume using random primers (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) and superscript II reverse transcriptase (according to the

manufacturer's instructions, Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Real time PCR analysis was performed on the 7000 Sequence Detection System with SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers used for ATP binding cassette transporters A1 (ABCA1), scavenger receptor BI (SR-BI), peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α), ATP synthase β chain and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) are listed in Table 1. Expression levels were normalized using GAPDH as housekeeping gene.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. The statistical analysis of kinetic and gene expression results was performed by Stat View 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) using Wilcoxon test, owing to the limited size of our groups that did not permit to be sure of normal distribution of the data. A p-value < 0.05 was considered to be significant.

In order to compare the groups and the effects of NA, the analysis of plasma lipid parameters has been performed by an Anova for repeated measures, using a linear mixed-effects model (Splus software-Version 6.2; TIBCO Software Inc, Somerville, MA, USA). A p-value < 0.05 was considered to be significant.

Results

Insulin sensitivity, plasma lipids and lipoproteins

Insulin sensitivity and lipid data are shown in Table 2. I_{IS} was reduced (-36%, $p < 0.05$) by NA. Plasma TG was also reduced (-32%, $p < 0.001$) as VLDL TG (-44%, $p < 0.05$). TC and plasma CE were reduced in the same magnitude (-27%, $p < 0.001$) while UC was unchanged. LDL-C (-43%, $p < 0.05$) and HDL-C (-27%, $p < 0.0001$) were also reduced. Plasma NEFA concentration was not changed by NA treatment as well as HDL-phospholipids. All these parameters did not change in the control group. Moreover, we did not highlight any statistical differences between the two groups at the beginning of the study.

ApoAI and cholesterol kinetics studies

During the kinetic study, the apoAI and CE concentrations in HDL remained constant (coefficients of variation $< 5\%$, data not shown) suggesting that each dog remained in a metabolic steady state during the course of the study. The results of the derived model were in agreement with experimental data.

The kinetics parameters are presented in Table 3. ApoAI concentration was reduced by NA (-13%, $p < 0.05$). HDL-apoAI fractional catabolic rate (FCR) was 2-fold higher ($p < 0.05$) as HDL-apoAI absolute production rate (APR) (1.8-fold higher, $p = 0.07$).

Cholesterol esterification rate (K_{LCAT}) was higher after 4 weeks of NA treatment (+42%, $p < 0.05$). HDL-CE concentration was reduced (-32%) after 4 weeks of NA treatment ($p < 0.05$) due to a higher HDL-CE FCR (+107%, $p < 0.05$). This higher catabolism was explained by both higher selective uptake (+108%, $p < 0.05$) and as mentioned above by a higher apoAI FCR. CE production rate was also higher after NA treatment (+40%, $p < 0.05$).

Cholesterol efflux and hepatic gene expression

NA treatment induced a significant enhancement of [³H]-cholesterol efflux by 16% (from 37.3 ± 2.3 to 43.4 ± 2.3% of ³H-cholesterol efflux in 4 hours of incubation) (p < 0.05). [³H]-cholesterol efflux did not change in the control group (36.1 ± 5.4 vs. 39.0 ± 8.0% of ³H-cholesterol efflux in 4 hours of incubation).

The hepatic mRNA expression of PPAR α , ABCA1 and SR-BI were unchanged by the 4 weeks of NA treatment (Fig. 2). Compared with baseline, expression of ATP synthase β chain was decreased by 40 ± 10% (p < 0.05). mRNA expression did not change in the control group for all studied genes.

Discussion

The metabolic syndrome associated dyslipidemia is by far a frequent form of atherogenic dyslipidemia, and NA appears to be interesting to correct these lipid disturbances. Nevertheless, insulin resistance is an important element of metabolic syndrome that should not be underestimated during any treatment. Consequently, we used insulin resistant dogs in order to consider all the component of this syndrome. We confirmed the deterioration of insulin resistance due to NA treatment that has already been shown (Fabbrini et al., 2010). However, data from several studies suggest that NA-induced insulin resistance dissipates by 16 weeks of therapy (Vega et al., 2005), and further studies would be needed to confirm whether such inconvenience could be adequately controlled by adjusting the concomitant antidiabetic pharmacotherapy.

The current study is the first to analyze the effect of NA by using a dual stable isotope endogenous labeling of HDL-C and apoAI. During tracer administration, rapid equilibration between lipoprotein fractions was obtained for UC enrichments (not shown) as previously reported in dogs (Ouguerram *et al.*, 2004) or humans (Ouguerram *et al.*, 2002). This observation demonstrates again as fast are the exchanges of UC between lipoproteins and argues for the use of plasma UC as precursor pool. We showed that NA treatment significantly enhanced the esterification activity (k_{LCAT}) and CE appearance in HDL, suggesting a concomitant higher effectiveness of tissular cholesterol efflux (Czarnecka and Yokoyama, 1996). This result is in accordance with the higher efficiency of HDL from NA-treated dogs to promote cholesterol efflux measured in Fu5AH cells. This cell line has been selected notably because it has been shown a direct binding of HDL to the cells (Karlin *et al.*, 1987), and highly reproducible data on cholesterol efflux have been provided in numerous studies (de la Llera Moya et al., 1994; Ripolles Piquer et al., 2006). Moreover, this cells exhibited the most rapid efflux of any cell line studied (Rothblat *et al.*, 1986). However, Fu5AH cells exhibit a high level of SR-BI expression

but lack functional ABCA1 in basal conditions. We confirmed a high level of efflux (more than 35% in 4h) that is elevated compared to humans in the same experimental conditions (25% in 4h) (Miwa *et al.*, 2009). Contrary to humans, the dog is a species in which cholesterol is mainly transported by HDL, and it is therefore logical to measure a higher efflux in dogs due to this higher level of cholesterol acceptors.

Previous published data obtained in hypercholesterolemic rabbits adipocytes treated with NA have shown an increase in cholesterol efflux, related to a higher mRNA expression of LXR α (Zhao *et al.*, 2008). It seems that NA up-regulates LXR α expression as a result of the activation of PPAR γ (Rubic *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). Moreover, ABCA1 and ABCG1 have been shown to be directly regulated by LXR α in macrophages (Costet *et al.*, 2000), and to mediate in these cells the cholesterol efflux induced by LXR α activation (Wang *et al.*, 2006). However, the absence of NA effect on ABCA1 transcript in our study is conflicting with these results and with previous data reported in macrophages, HepG2 cells and adipocytes (Rubic *et al.*, 2004; Siripurkpong and Na-Bangchang, 2008; Wu and Zhao, 2009). Nevertheless, in our study, the ABCA1 expression was measured in liver. As macrophages play a major role in RCT initiation (i.e. cholesterol efflux) (Wang *et al.*, 2007), and as previous studies have shown that these cells could be one of the major targets of NA (Knowles *et al.*, 2006), liver ABCA1 is probably not the main target of NA contrary to the macrophage ABCA1. Unfortunately, we have not measured its expression in these cells.

The significant reduction in HDL-CE is a result of a higher catabolism (FCR), which is the consequence of enhancement in both apoAI-dependent CE uptake and CE selective uptake. We did not show any effect of NA on SR-BI hepatic expression, that is in accordance with a previous study that also reported no change in SR-BI expression or CE transport activity in liver (Nieland *et al.*, 2007). This conflict between the higher HDL-CE catabolism and the unchanged SR-BI

expression suggest that NA could affect other pathways involved in CE turnover and selective uptake, such as the transintestinal cholesterol excretion. This pathway could involve intestinal mechanisms regulated by LXR (Yu *et al.*, 2003), and NA has been described as a potential LXR activator (Zhao *et al.*, 2008). The mechanistic aspects of this pathway are actually under investigation and the effect of NA on it should be further examined.

We observed a significant elevation in apoAI FCR resulting in a lowered apoAI plasma level. ATP synthase β chain has been described as a HDL receptor (Martinez *et al.*, 2003), and recently, its expression on cell membranes has been reported to be repressed by NA (Zhang *et al.*, 2008). Our results of gene expression are in accordance with these findings. However, this suggests that the *in vivo* relevance of ATP synthase β chain would be minor as we have observed a higher apoAI FCR and a reduced ATP synthase β chain expression. Kinetic studies available in humans concerning NA on HDL are scarce and have not analyzed cholesterol turnover. One study in 2 healthy subjects reported a lower HDL apoAI catabolism (Blum *et al.*, 1977) while no change was reported in another study in five healthy subjects (Shepherd *et al.*, 1979). Recently, a significant higher apoAI production rate with no change in catabolic rate was reported in 5 patients with combined hyperlipidemia (Lamon-Fava *et al.*, 2008). The reduction in HDL-C and apoAI related to NA observed in dogs is the main difference compared to humans while the reduction in TG was identical in both species. In mouse, another species devoid of CETP, no change in HDL-C has been observed as a consequence of NA treatment although a reduction in plasma TG (Hernandez *et al.*, 2007). These studies in two animal species highlighted the specific role of the CETP in the NA-mediated HDL-C elevation.

We and others have shown that HDL-apoAI FCR is directly correlated to plasma TG through CETP activity (Brinton *et al.*, 1991; Frenais *et al.*, 1997). To date, most of the studies concur to place CETP firmly at the heart of the process mediated by NA (Chapman *et al.*, 2009), which

directly leads to efficacious elevation of both HDL-C and apoAI in humans. Nevertheless, our study showed that NA also accelerates the HDL turn-over leading to a HDL-C and apoAI reduction. However, as the dog presents an active RCT performed by a high LCAT activity followed by an efficient selective HDL-CE uptake independent of apoAI catabolism (Ouguerram *et al.*, 2004), the enhancement of HDL turn-over that we described might have been easier to highlight in dog than in mouse. Moreover, due to the important role of CETP in RCT (Ouguerram *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2008), the preponderance of the CETP-mediated HDL-C elevation could have hidden the possible higher HDL-CE turn-over in humans. Then, we can speculate in species having CETP, NA could act through two opposite pathways: i) by elevating HDL-C as a result of a lowered plasma TG concentration through reducing CE transport towards diminished TG-rich lipoproteins and ii) by lowering HDL as a result of a higher HDL FCR, which would reflect a more active RCT.

In conclusion, this study showed that NA treatment in obese insulin resistant dog reduces HDL-C by raising catabolic rate secondary to both higher HDL endocytosis and HDL-CE selective uptake. NA also promotes cholesterol efflux and esterification, key processes in RCT. These results suggest that NA treatment could improve RCT in humans and highlight the interest to perform kinetic study using endogenous cholesterol labeling in humans.

Acknowledgments

The authors are grateful to Samuel Ninet, Nadia Guignard, Stéphanie Crossouard, Maud Chétiveaux and Philippe Bleis for taking care of the animals, and for technical assistance.

Liste of references

- Altschul R, Hoffer A and Stephen JD (1955) Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem* **54**:558-559.
- Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T and Ouguerram K (2003a) Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism* **52**:559-564.
- Bailhache E, Ouguerram K, Gayet C, Krempf M, Siliart B, Magot T and Nguyen P (2003b) 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**:86-95.
- Blum CB, Levy RI, Eisenberg S, Hall M, 3rd, Goebel RH and Berman M (1977) High density lipoprotein metabolism in man. *J Clin Invest* **60**:795-807.
- Brinton EA, Eisenberg S and Breslow JL (1991) Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* **87**:536-544.
- Canner PL, Berge KG, Wenger NK, Stamler J, Friedman L, Prineas RJ and Friedewald W (1986) Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol* **8**:1245-1255.
- Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M and Kontush A (2009) Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur Heart J*.
- Costet P, Luo Y, Wang N and Tall AR (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* **275**:28240-28245.

- Czarnecka H and Yokoyama S (1996) Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J Biol Chem* **271**:2023-2028.
- de la Llera Moya M, Atger V, Paul JL, Fournier N, Moatti N, Giral P, Friday KE and Rothblat G (1994) A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb* **14**:1056-1065.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Korenblat KM, Magkos F, McCrea J, Patterson BW and Klein S (2010) Effect of Fenofibrate and Niacin on Intrahepatic Triglyceride Content, Very Low-Density Lipoproteins Kinetics, and Insulin Action in Obese Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Frenais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Maugere P, Krempf M and Magot T (1997) High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia* **40**:578-583.
- Goldberg A, Alagona P, Jr., Capuzzi DM, Guyton J, Morgan JM, Rodgers J, Sachson R and Samuel P (2000) Multiple-dose efficacy and safety of an extended-release form of niacin in the management of hyperlipidemia. *Am J Cardiol* **85**:1100-1105.
- Haneda K and Horiuchi T (1986) A method for measurement of total circulating blood volume using indocyanine green. *Tohoku J Exp Med* **148**:49-56.
- Hernandez M, Wright SD and Cai TQ (2007) Critical role of cholesterol ester transfer protein in nicotinic acid-mediated HDL elevation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **355**:1075-1080.

- Karlin JB, Johnson WJ, Benedict CR, Chacko GK, Phillips MC and Rothblat GH (1987) Cholesterol flux between cells and high density lipoprotein. Lack of relationship to specific binding of the lipoprotein to the cell surface. *J Biol Chem* **262**:12557-12564.
- Khoo JC, Pittman RC and Rubin EM (1995) Selective uptake of HDL cholesteryl esters is active in transgenic mice expressing human apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* **36**:593-600.
- Knowles HJ, te Poele RH, Workman P and Harris AL (2006) Niacin induces PPARgamma expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74a-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways. *Biochem Pharmacol* **71**:646-656.
- Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Barrett PH, Buchsbaum A, Nyaku M, Horvath KV, Asztalos BF, Otokozawa S, Ai M, Matthan NR, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG and Schaefer EJ (2008) Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:1672-1678.
- Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Terce F, Collet X, Perret B and Barbaras R (2003) Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* **421**:75-79.
- Miwa K, Inazu A, Kawashiri M, Nohara A, Higashikata T, Kobayashi J, Koizumi J, Nakajima K, Nakano T, Niimi M, Mabuchi H and Yamagishi M (2009) Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP-deficient patients. *Clin Chim Acta* **402**:19-24.
- Nieland TJ, Shaw JT, Jaipuri FA, Maliga Z, Duffner JL, Koehler AN and Krieger M (2007) Influence of HDL-cholesterol-elevating drugs on the in vitro activity of the HDL receptor SR-BI. *J Lipid Res* **48**:1832-1845.

- Ouguerram K, Krempf M, Maugeais C, Maugere P, Darmaun D and Magot T (2002) A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism* **51**:5-11.
- Ouguerram K, Magot T and Lutton C (1996) Metabolism of plasma lipoproteins in the genetically hypercholesterolemic rat (RICO). *Metabolism* **45**:4-11.
- Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E and Magot T (2004) 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* **138**:339-345.
- Pittman RC, Knecht TP, Rosenbaum MS and Taylor CA, Jr. (1987) A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *J Biol Chem* **262**:2443-2450.
- Radziuk J (2000) Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:4426-4433.
- Ripolles Piquer B, Nazih H, Bourreille A, Segain JP, Huvelin JM, Galmiche JP and Bard JM (2006) Altered lipid, apolipoprotein, and lipoprotein profiles in inflammatory bowel disease: consequences on the cholesterol efflux capacity of serum using Fu5AH cell system. *Metabolism* **55**:980-988.
- Rothblat GH, Bamberger M and Phillips MC (1986) Reverse cholesterol transport. *Methods Enzymol* **129**:628-644.
- Rubic T, Trottmann M and Lorenz RL (2004) Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin. *Biochem Pharmacol* **67**:411-419.

- Shepherd J, Packard CJ, Patsch JR, Gotto AM, Jr. and Taunton OD (1979) Effects of nicotinic acid therapy on plasma high density lipoprotein subfraction distribution and composition and on apolipoprotein A metabolism. *J Clin Invest* **63**:858-867.
- Siripurkpong P and Na-Bangchang K (2008) Effects of niacin and chromium on the expression of ATP-binding cassette transporter A1 and apolipoprotein A-1 genes in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*.
- Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, Erqou S, Saleheen D, Dullaart RP, Keavney B, Ye Z and Danesh J (2008) Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA* **299**:2777-2788.
- Vega GL, Cater NB, Meguro S and Grundy SM (2005) Influence of extended-release nicotinic acid on nonesterified fatty acid flux in the metabolic syndrome with atherogenic dyslipidemia. *Am J Cardiol* **95**:1309-1313.
- Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F and Tall AR (2006) LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:1310-1316.
- Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR and Rader DJ (2007) Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* **117**:2216-2224.
- Wu ZH and Zhao SP (2009) Niacin promotes cholesterol efflux through stimulation of the PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Pharmacology* **84**:282-287.
- Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC and Hobbs HH (2003) Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* **278**:15565-15570.

Zhang LH, Kamanna VS, Zhang MC and Kashyap ML (2008) Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *J Lipid Res* **49**:1195-1201.

Zhao SP, Yang J, Li J, Dong SZ and Wu ZH (2008) Effect of niacin on LXRalpha and PPARgamma expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol* **124**:172-178.

Figure legends

Figure 1: Monocompartmental model used for the modeling of apolipoprotein AI (apoAI) (A) and HDL cholesteryl ester (B) turnover in dogs. UC, unesterified cholesterol; CE, cholesteryl ester; k_{O1} , apoAI uptake; $k_{O1'}$, CE selective uptake; k_{LCAT} , cholesterol esterification rate.

Figure 2: Relative expression of PPAR α , ABCA1, SR-BI and ATP synthase mRNA in liver of control (n = 3) and treated (n = 6) dogs, before the treatment (in black) and after 4 weeks of treatment (in white). Values are presented as the mean \pm SEM. * p < 0.05 versus baseline. (PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor α , ABCA1: ATP binding cassette A1, SR-BI: scavenger receptor class B type I).

Table 1: Sense/antisens primers used for ABCA1, SR-BI, PPAR α , ATP synthase β chain and GAPDH relative quantification

Gene	Primers sense/antisense
ABCA1	5'-TGGACAGCAGAAGCAATGAC-3'
	5'-TAAGCCGACTTCTGTTGCT-3'
SR-BI	5'-AGGGCAAGTTTGGGCTATTT-3'
	5'-GAATTCCAGCGAGGTCTCAG-3'
PPAR α	5'-TTATCACAGACACGCTCTCACC-3'
	5'-GTGGACTCCGTAATGGTAGC-3'
ATP synthase	5'-ACCATTGAAGAAGCTGTGG-3'
	5'-CATGTGGCCTACAGAGCAA-3'
GAPDH	5'-ACAGTCAAGGCTGAGAACGG-3'
	5'-CCACAACATACTCAGCACCAGC-3'

Table 2: Body weight (BW), insulin sensitivity index (I_{IS}), fasting plasma triglycerides (TG), total cholesterol (TC), unesterified cholesterol (UC), esterified cholesterol (EC), non esterified fatty acid (NEFA), VLDL-triglycerides (VLDL-TG), LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-cholesterol (HDL-C), HDL-phospholipids (HDL-PL) and apolipoprotein AI (apoAI) concentrations in control (n = 3) and NA dogs (n = 6) before (week 0) and at the end of the treatment (week 4). No statistical differences have been measured between the two groups for week 0. Values are presented as mean \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001 for week 4 vs. week 0. † Due to a technical problem, one treated dog could not be studied for insulin sensitivity measurement.

	Control (n=3)		Treated (n=6)	
	Week 0	Week 4	Week 0	Week 4
BW (kg)	15.38 \pm 1.62	15.00 \pm 1.53	16.8 \pm 0.7	16.3 \pm 0.6
I_{IS}	0.14 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01 *,†
TG (mmol.L ⁻¹)	0.87 \pm 0.05	0.87 \pm 0.08	0.97 \pm 0.11	0.67 \pm 0.09 **
TC (mmol.L ⁻¹)	4.80 \pm 0.15	4.55 \pm 0.29	4.60 \pm 0.19	3.38 \pm 0.15 ***
UC (mmol.L ⁻¹)	0.85 \pm 0.05	0.87 \pm 0.08	0.83 \pm 0.02	0.82 \pm 0.03
EC (mmol.L ⁻¹)	4.05 \pm 0.08	3.84 \pm 0.13	3.92 \pm 0.23	2.85 \pm 0.30 **
NEFA (mmol.L ⁻¹)	0.87 \pm 0.12	0.90 \pm 0.06	0.86 \pm 0.10	1.01 \pm 0.09
VLDL-TG (mmol.L ⁻¹)	0.09 \pm 0.04	0.10 \pm 0.04	0.18 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02 *
LDL-C (mmol.L ⁻¹)	0.31 \pm 0.04	0.29 \pm 0.07	0.46 \pm 0.06	0.26 \pm 0.05 *
HDL-C (mmol.L ⁻¹)	4.18 \pm 0.25	4.02 \pm 0.38	4.01 \pm 0.14	2.92 \pm 0.13 ***
HDL-PL (mmol.L ⁻¹)	1.47 \pm 0.26	1.68 \pm 0.34	1.26 \pm 0.12	1.49 \pm 0.10
ApoAI (g.L ⁻¹)	0.70 \pm 0.10	0.69 \pm 0.14	0.95 \pm 0.02	0.83 \pm 0.04 *

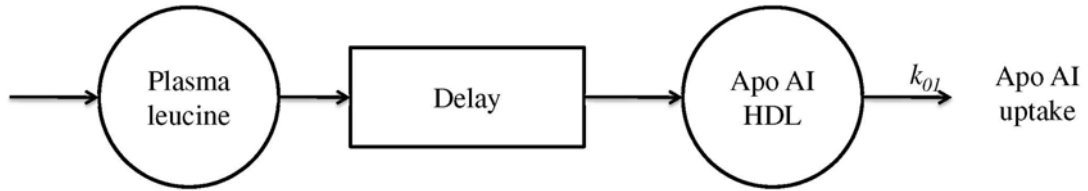
Table 3: Kinetic parameters of HDL apolipoprotein AI and HDL-CE before (week 0) and after 4 weeks of NA treatment (week 4) identified using models of fig. 1. FCR, fractional catabolic rate; APR, absolute production rate; HDL-UC, HDL unesterified cholesterol concentration; HDL-CE, HDL cholesteryl ester concentration; K_{LCAT} , cholesterol esterification by LCAT. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 6).

	Week 0	Week 4	P
HDL-ApoAI ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.95 ± 0.02	0.83 ± 0.04	< 0.05
APR ApoAI ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.248 ± 0.027	0.443 ± 0.089	< 0.1
FCR ApoAI (k_{01} , h^{-1})	0.0058 ± 0.0006	0.0122 ± 0.024	< 0.05
HDL-CE ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.30 ± 0.05	0.88 ± 0.05	< 0.05
APR HDL-CE ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	1.69 ± 0.26	2.37 ± 0.26	< 0.05
FCR HDL-CE (h^{-1})	0.030 ± 0.006	0.062 ± 0.010	< 0.05
K_{LCAT} (h^{-1})	0.118 ± 0.019	0.166 ± 0.021	< 0.05
Selective uptake (k_{01} , h^{-1})	0.024 ± 0.006	0.050 ± 0.009	< 0.05

Figure 1:

Figure 1

A



B

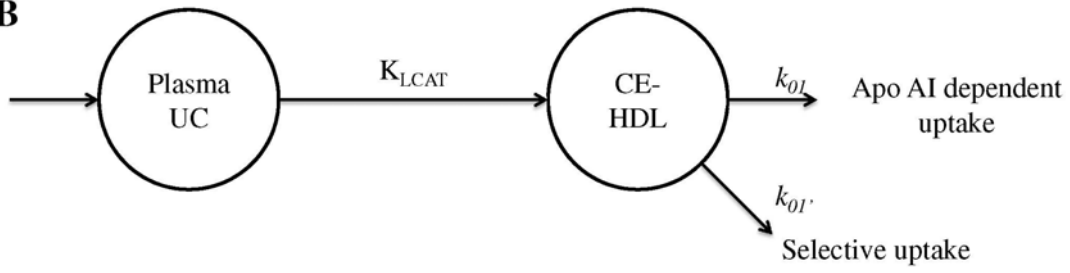
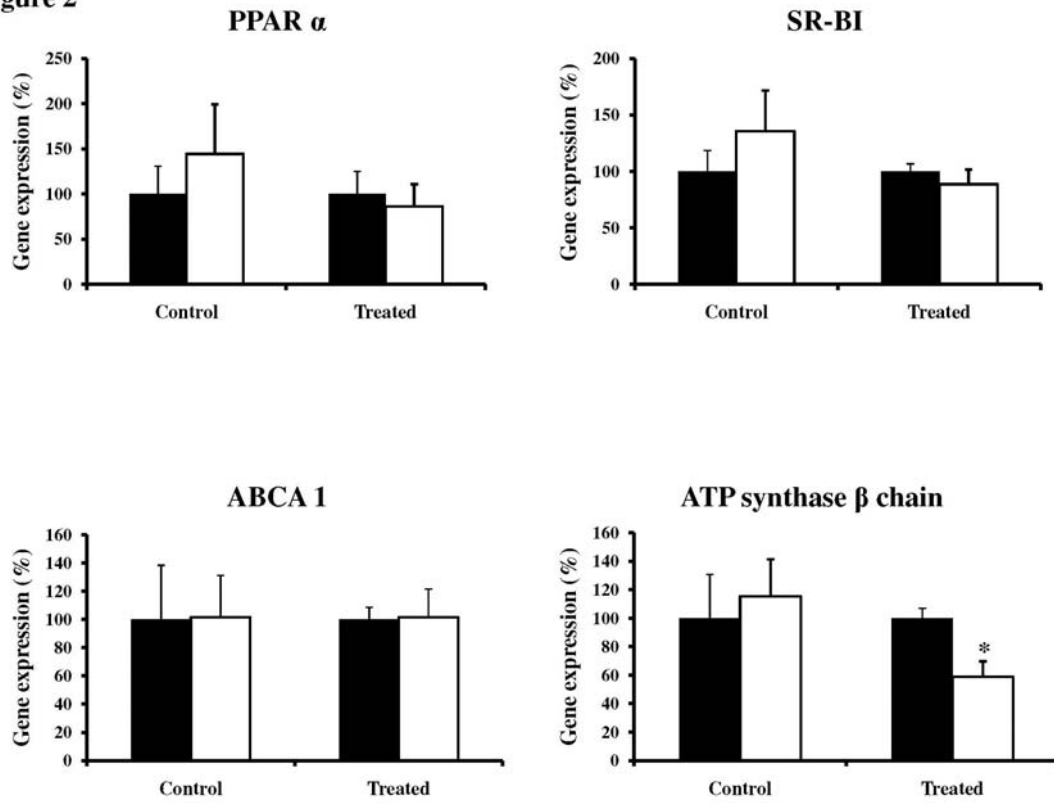


Figure 2:

Figure 2



V.3 Discussion

Pour ce protocole, nous avons choisi un modèle animal obèse et insulino-résistant comme modèle d'étude. En effet, l'AN est une alternative thérapeutique intéressante pour traiter la dyslipidémie du syndrome métabolique et il nous semble important de pouvoir prendre en compte l'ensemble des perturbations du syndrome métabolique dans l'analyse des résultats. Nous confirmons que l'AN entraîne une dégradation de la sensibilité à l'insuline (Fabbrini et al., 2010). Cependant, des études ont montré une normalisation de la sensibilité à l'insuline après 16 semaines de traitement (Vega et al., 2005). Cet effet secondaire de l'AN se doit d'être pris en compte et surveillé chez les patients atteints de syndrome métabolique, mais ne devrait pas restreindre l'utilisation de cette molécule pour cette catégorie de patient.

Dans cette étude, nous observons une diminution des concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol total et LDL-cholestérol à un niveau proche de ce qui est observé chez l'homme. Cependant, contrairement aux études humaines, nous mesurons également une diminution de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol et apoAI. La réduction de l'apoAI s'explique par une forte augmentation de son catabolisme. Parallèlement, nous mesurons une diminution de l'expression hépatique de la chaîne β de l'*ATP synthase*. Ce récepteur a été décrit comme réalisant l'endocytose des HDL (Martinez *et al.*, 2003), et récemment son expression à la surface des cellules a été montrée comme étant diminuée par l'AN (Zhang *et al.*, 2008). Nous confirmons donc ce résultat, mais la hausse du catabolisme des HDL suggère une faible importance de l'*ATP synthase* dans le catabolisme *in vivo* des HDL.

L'étude de l'efflux de cholestérol *in vivo* montre que l'AN augmente la capacité des HDL à accepter le cholestérol cellulaire. De plus, nous mesurons une augmentation du paramètre d'estérification du cholestérol (k_{LCAT}), ce qui est en accord avec un accroissement de l'efflux. Nous observons également une baisse du HDL-cholestérol qui est contraire aux études préalablement menées chez l'homme. Néanmoins, la CETP a été décrite comme essentielle dans cette augmentation du HDL-cholestérol (Hernandez et al., 2007) et nos résultats chez le chien, espèce dépourvue de CETP, sont donc cohérents. Cette diminution du HDL-cholestérol s'explique principalement par une diminution du cholestérol estérifié des HDL, elle-même due à une augmentation de leur capture sélective et de la capture apoAI-dépendante. Cependant, l'expression hépatique du SR-BI n'a pas été modifiée par le traitement. Il existe donc une

contradiction entre cette expression inchangée et la hausse de la capture sélective. On peut supposer que l'AN modifie une autre voie d'élimination du cholestérol tel que le *transintestinal cholesterol excretion* (Kruit et al., 2006). En effet, cette voie a été décrite comme étant modulée par LXR et l'AN est un activateur potentiel de ce facteur de transcription (Zhao *et al.*, 2008). Cette voie métabolique dont l'importance quantitative est suggérée par nos résultats est actuellement en cours d'investigation au laboratoire et sa possible modulation par l'AN est à envisager.

Cette étude confirme l'importance de la CETP dans l'élévation du HDL-cholestérol modulée par l'AN. Néanmoins, nous mettons en évidence des effets indépendants de la CETP, conduisant à une réduction de la concentration plasmatique en apoAI et de HDL-cholestérol. Les hausses de l'efflux de cholestérol, de l'activité d'esterification du cholestérol et de la capture sélective des esters de cholestérol montrent néanmoins que l'AN permet une accélération du transport inverse du cholestérol qui pourrait expliquer, du moins en partie, la réduction de l'athérosclérose observée avec l'AN.

VI. Effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur le transport inverse du cholestérol

VI.1 Introduction

On a clairement montré qu'une forte consommation d'acides gras polyinsaturés oméga 3 d'origine marine (acide eicosapentaénoïque [EPA] et acide docosahexaénoïque [DHA]) était associée à un risque cardiovasculaire réduit (Vrablik et al., 2009). Néanmoins, les mécanismes reliant les acides gras polyinsaturés ω 3 et le risque cardiovasculaire ne sont pas complètement élucidés. De nombreuses études ont montré que l'EPA et le DHA pouvait avoir des effets positifs sur les arythmies (Matthan et al., 2005), la coagulation et la fonction plaquettaire (Din et al., 2008), ou encore la fonction endothéliale (Woodman et al., 2003). L'ensemble de ces effets participent sans aucun doute à la protection vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Cependant, ces acides gras sont surtout connus pour leurs effets hypotriglycéridémiant (Davidson, 2006). Leurs effets sur le cholestérol sont à l'inverse moins connus, et notamment en ce qui concerne le HDL-cholestérol. En effet, de nombreuses études ne montrent aucun impact d'une supplémentation en AGPI ω 3 sur le HDL-cholestérol (Harris, 1997b, Harris, 1997a). A l'inverse, une hausse de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol a été observée après une supplémentation en DHA chez l'Homme, mais pas après une supplémentation en EPA (Mori et al., 2000).

La modulation du transport inverse du cholestérol (TIC) par les AGPI ω 3 est également controversée. La plus grande partie des études n'a pas mis en évidence de changement dans l'efficacité du TIC, mais celles-ci utilisaient des méthodes d'investigations ne permettant pas une réelle analyse de cette voie métabolique. Récemment, grâce à une nouvelle méthode de mesure basée sur l'injection de macrophages chargés en cholestérol radiomarqué et par le suivi de la radioactivité dans les différents compartiments impliqués dans le TIC (plasma, foie, bile et fèces), Nishimoto et al. (2009) ont montré une amélioration globale du TIC chez la souris supplémentée en huile de poisson. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la modulation du TIC par l'EPA et le DHA en utilisant la méthode de marquage des HDL sur le cholestérol et sur l'apoAI. Pour cela, huit chiennes obèses et insulino-résistantes ont été supplémentées en EPA et DHA (920 mg et 760

mg par jour respectivement), et ce pendant 6 semaines. Avant et à la fin de la période de supplémentation, des dosages de lipides et lipoprotéines plasmatiques ont été réalisées, ainsi que la mesure de la sensibilité à l'insuline. Des biopsies de foie ont été réalisées, ainsi que le marquage du cholestérol par une perfusion de ^{13}C -acétate et de l'apoAI par une perfusion de ^3D -leucine. Enfin, des mesures d'efflux de cholestérol sur des cellules Fu5AH en culture ont également été réalisées. En raison du temps nécessaire à l'analyse et à la modélisation des études de renouvellement des lipoprotéines et du cholestérol, nous allons présenter uniquement des résultats préliminaires.

VI.2 Matériels et méthodes

Animaux et traitements

Huit chiennes obèses et insulino-résistantes (âge moyen : $2,7 \pm 0,1$ an) ont été utilisées dans cette étude. Les animaux ont été nourris avec un régime sec, commercial (25% de protéines, 14% de matière grasse, 4 kcal d'énergie métabolisable/g). Ce régime a été complété par 920 mg/j d'EPA et 760 mg/j de DHA (Omacor, Laboratoire P. Fabre, Castres, France), sous forme d'esters éthyliques. La durée de la supplémentation a été de 6 semaines. Les animaux ont été hébergés à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes, en accord avec les règles du ministère de l'agriculture et de la pêche. Le protocole expérimental était en accord avec les règles de l'union européenne et a été validé par le comité local d'éthique.

Lipides plasmatiques et analyse des lipoprotéines

Des prélèvements sanguins ont été réalisés à jeun au niveau de la veine jugulaire et placés dans des tubes contenant de l'EDTA. Les échantillons ont été immédiatement centrifugés (5000rpm à 4°C pendant 10 min) et le plasma stocké (-80°C) pour les analyses ultérieures. Les lipoprotéines ont été séparées en fonction de leur densité par FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). La concentration en triglycérides et en cholestérol des lipoprotéines a été mesurée dans chaque fraction collectée à l'issue de la séparation. Les triglycérides et le cholestérol du plasma et des lipoprotéines, ainsi que les acides gras non estérifiés plasmatiques, ont été mesurés à l'aide de méthodes colorimétriques enzymatiques (Cholesterol RTU, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France; Triglycerides enzymatique TG PAP150, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France ; NEFA C, WAKO, Oxoid, Dardilly, France).

Composition corporelle

La composition corporelle (masse maigre et masse grasse) a été déterminée par la méthode de dilution isotopique. 0,5 mL/kg de D₂O (99,9% D/H; Eurisotop, Gif-sur-Yvette, France) a été injecté en sous-cutané à des chiens à jeun et un prélèvement sanguin a été réalisé 5 h plus tard. Le sang a été immédiatement centrifugé à 5000 rpm à 4°C pendant 10 min. La

concentration plasmatique en deutérium a ensuite été mesurée par un spectromètre infrarouge à transformé de Fourier (IRTF) (Brüker SA, Wissembourg, France).

Clamp euglycémique hyperinsulinémique

Un clamp euglycémique hyperinsulinémique a été réalisé sur chaque chien, à jeun, afin de déterminer la sensibilité à l'insuline. Pour cela, de l'insuline humaine (Actrapid; NovoNordisk, Bagsvaerd, Danemark) a été perfusée pour induire une hyperinsulinémie (4 mU.kg^{-1} pendant 1 min puis $2 \text{ mU.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ pour le reste du clamp). Du glucose (Glucose 20%; Laboratoire Aguettant, Lyon, France) a ensuite été perfusé à un niveau variable, en ajustant ce niveau par rapport à la glycémie mesurée, en recherchant le retour de la glycémie à son niveau basal et jusqu'à obtention d'un plateau de perfusion stable pendant 1 h. Des échantillons sanguins ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire, toutes les 5 min de 0 à 60 min, puis toutes les 10 min entre 60 et 180 min. Ces échantillons sanguins ont été placés dans des tubes héparinés, centrifugés à 5000 rpm à 4°C pendant 10 min, puis stockés à -80°C pour les analyses ultérieures. L'index de sensibilité à l'insuline (I_{IS}) se définit par le ratio entre le taux de glucose perfusé au plateau (en $\text{mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) et la concentration en insuline à ce plateau ($\mu\text{U.mL}^{-1}$). La détermination de la glycémie a été réalisée par la méthode de la glucose oxydase (Glucotrend® Plus; Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). La concentration plasmatique en insuline a été réalisée à l'aide d'un kit de radio-immuno-essai commercial (RIA Insik-5; Diasorin, Saluggia, Italie).

Analyse de l'expression des gènes

Purification des ARNm

Après prélèvement sous anesthésie générale, environ 100 mg de foie ont été lavés dans du sérum physiologique. Du réactif TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a été ajouté et l'échantillon a été immédiatement congelé dans l'azote liquide. Les ARN ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol, suivant les recommandations du fabricant. La concentration des ARN totaux a par la suite été déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm.

RT-PCR semi-quantitative

1 µg d'ARN a été transformé en ADNc en utilisant un mélange d'amorces (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) et une transcriptase inverse (superscript II reverse transcriptase, Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Les mesures de PCR en temps réel ont été réalisées avec le SYBR green comme marqueur fluorescent et un mix commercial contenant les différents nucléotides et une ADN polymérase recombinante (PCR Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les primers spécifiques de gènes d'intérêt étaient : PPARα (sens : *TTATCACAGACACGCTCTCACC*, antisens : *GTGGACTCCGTAATGGTAGC*), SR-BI (sens : *AGGGCAAGTTTGGGCTATTT*, antisens : *GAATTCCAGCGAGGTCTCAG*), ABCA1 (sens : *TGGACAGCAGAAGCAATGAC*, antisens : *TAAGCCGACTTCTGTTGCT*), GAPDH (sens : *ACAGTCAAGGCTGAGAACGG*, antisens : *CCACAACATACTCAGCACCAGC*). La GAPDH a été utilisé comme gène de ménage pour normaliser les expressions.

Mesure de l'efflux de cholestérol *in vivo*

La capacité du plasma à réaliser un efflux de cholestérol a été mesurée en utilisant des cellules Fu5AH chargée en [³H]-cholesterol. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM (Eagle's minimum essential medium, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) enrichi en sérum de veau fœtal (SVF) à 10% (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). De la pénicilline, de la streptomycine et de la glutamine étaient présent dans le milieu.

Pour les mesures d'efflux, les cellules ont été placées sur des plaques 24 puits coatées, et cultivées dans le milieu approprié enrichi à 10% en SVF, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Lorsque la confluence était presque atteinte, les cellules ont été incubées pendant 24 h à 37°C dans un milieu enrichi de [1,2-³H]-cholesterol (1 µCi/mL dans du EMEM enrichi à 10% avec du SVF). Pour s'assurer de la bonne répartition du marquage, le milieu a été ensuite remplacé avec du EMEM contenant 1% de BSA (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) et incubée dans de l'albumine pendant 18 à 20 h avant les mesures d'efflux. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées durant 4 h avec le sérum canin dilué dans du EMEM (5%, vol/vol). A la fin de cette période de 4 h, le milieu de culture a été récupéré et la radioactivité de celui-ci a été mesurée par scintillation liquide. La radioactivité résiduelle des cellules a été mesurée après extraction à l'isopropanol. Le pourcentage d'efflux est calculé en réalisant le rapport entre la radioactivité du milieu sur le radioactivité totale.

Cinétique de renouvellement du cholestérol et de l'apoAI

Les cinétiques de renouvellement des lipoprotéines ont été réalisées comme décrit précédemment (Ouguerram et al., 2004) en utilisant une perfusion constante de [1,2 ¹³C₂] acétate et de [5,5,5 ²H₃] leucine, comme précurseur respectivement des esters de cholestérol et de l'apoAI. La durée de la perfusion a été de 8 h. Des échantillons sanguins ont été prélevés à 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 8.25, 9, 10, 24 et 26 h et placés immédiatement dans des tubes contenant de l'EDTA. De l'azide de sodium (inhibiteur de la prolifération bactérienne), un inhibiteur de protéase (Pefabloc, Interchim, Montluçon, France) et du 5,5-dithio-bis-nitro benzoate (DTNB), un inhibiteur de la LCAT, ont été ajoutés aux échantillons. L'enrichissement isotopique de la leucine a été mesurée pour l'apo AI des HDL et la leucine plasmatique par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les mesures d'enrichissement en ¹³C du cholestérol ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à une chambre de combustion et à un spectromètre de masse de rapport isotopique. Les analyses cinétiques seront réalisées à l'aide du programme SAAMII (SAAM Institute, Seattle, WA, USA), en utilisant le modèle monocompartimental présenté dans l'article 5.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne (n=8) ± SEM. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Student pour échantillons appariés ou par un test de Wilcoxon pour les données n'ayant pas de distribution suivant la loi normale. Les analyses ont été effectuées sur le logiciel Statview (SAS Institute, Cary, NC) et les résultats ont été considérés comme significatifs pour une valeur de p inférieure à 0,05.

VI.3 Résultats

Le tableau 11 résume les effets de la supplémentation en AGPI ω 3 sur les paramètres plasmatiques, le poids, la composition corporelle et la sensibilité à l'insuline.

Tableau 11 : Poids, masse grasse, indice de sensibilité à l'insuline et concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol, acides gras non estérifiés, glucose et insuline avant et à la fin de la période de supplémentation. * $p < 0,05$.

	Etat basal	Omega 3
Triglycérides (mmol.L⁻¹)	0,94 ± 0,04	0,73 ± 0,06 *
Cholestérol total (mmol.L⁻¹)	6,64 ± 0,41	5,36 ± 0,30 *
Acides gras non estérifiés (mmol.L⁻¹)	0,86 ± 0,09	0,93 ± 0,09
Glycémie (mmol.L⁻¹)	4,73 ± 0,08	4,61 ± 0,12
Insulinémie (μUI.mL⁻¹)	20,0 ± 2,4	22,0 ± 3,2
Poids (kg)	19,21 ± 1,11	18,73 ± 1,54
Masse grasse (%)	43,20 ± 0,02	40,59 ± 0,03
Indice de sensibilité à l'insuline	0,085 ± 0,009	0,103 ± 0,015 *

Comme attendu, la concentration plasmatique en triglycéride a été diminuée par la supplémentation, tout comme celle en cholestérol total. A l'inverse, la concentration en acides gras non estérifiés, la glycémie et l'insulinémie n'ont pas été affecté par l'EPA et le DHA. Il est intéressant de noter que, dans notre modèle de chien insulino-résistant, la supplémentation en AGPI ω 3 a permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline, et ce, sans modification du poids ou de la masse grasse.

La figure 20 présente la répartition du cholestérol au sein des différentes lipoprotéines après une séparation sur FPLC. Nous observons une réduction de la concentration plasmatique de LDL-cholestérol (somme des fractions 11 à 29) alors que celle de HDL-cholestérol (somme des fractions 30 à 55) n'est pas modifiée. Cependant, nous observons une modification de la taille des

HDL. En effet, après supplémentation, les HDL sont éluées plus tardivement, ce qui signifie que leur densité a augmenté et que leur taille a par conséquent diminué.

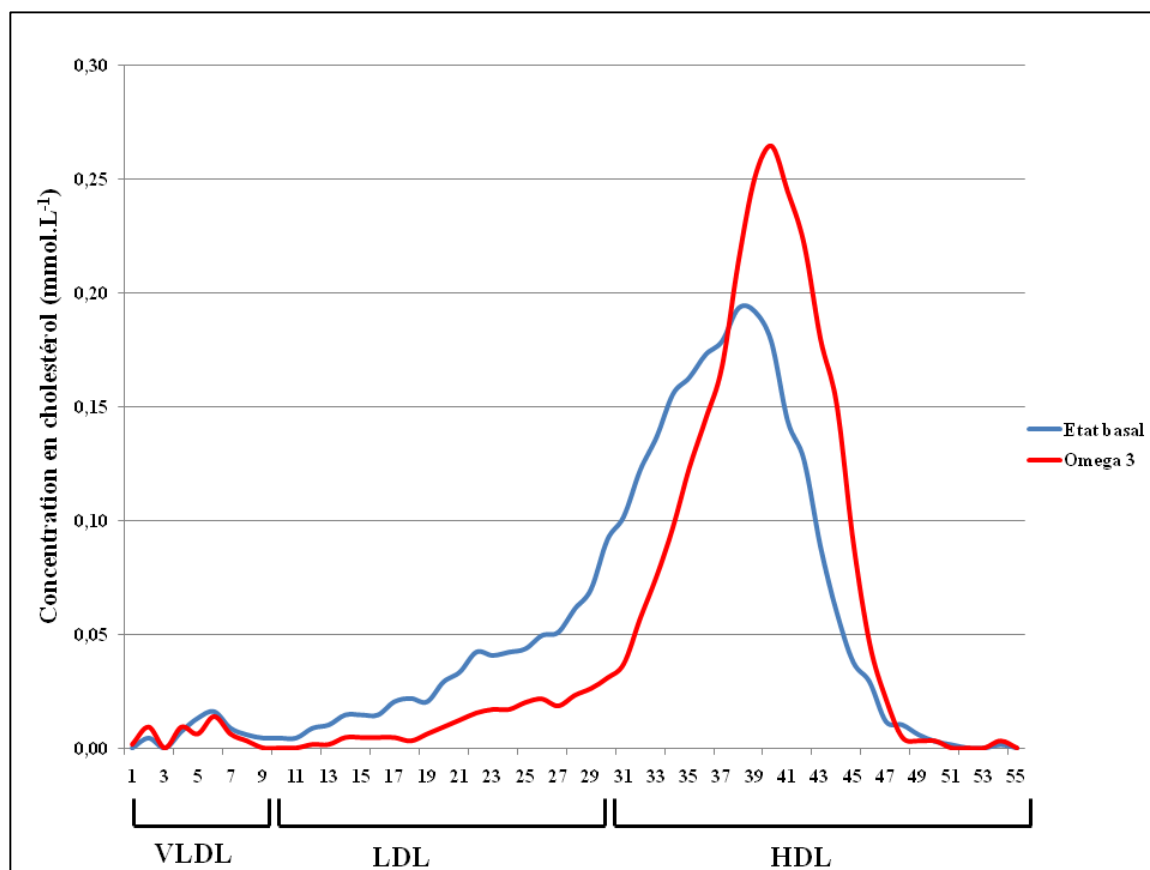


Figure 20 : Concentration en cholestérol dans les différentes lipoprotéines après séparation sur FPLC avant et à la fin de la période de supplémentation. Les lipoprotéines sont éluées en fonction de leur densité, les particules les plus grosses (i.e. les moins denses, VLDL) étant éluées en premier tandis que les particules les plus petites (i.e. les plus denses, HDL) sont éluées en dernier. Fractions 1 à 10 : VLDL, fractions 11 à 29 : LDL, Fractions 30 à 55 : HDL.

Comme le montre la figure 21, la diminution de la triglycéridémie s'explique par une réduction des triglycérides au sein des VLDL (somme des fractions 1 à 10) mais également au sein des HDL (somme des fractions 30 à 55).

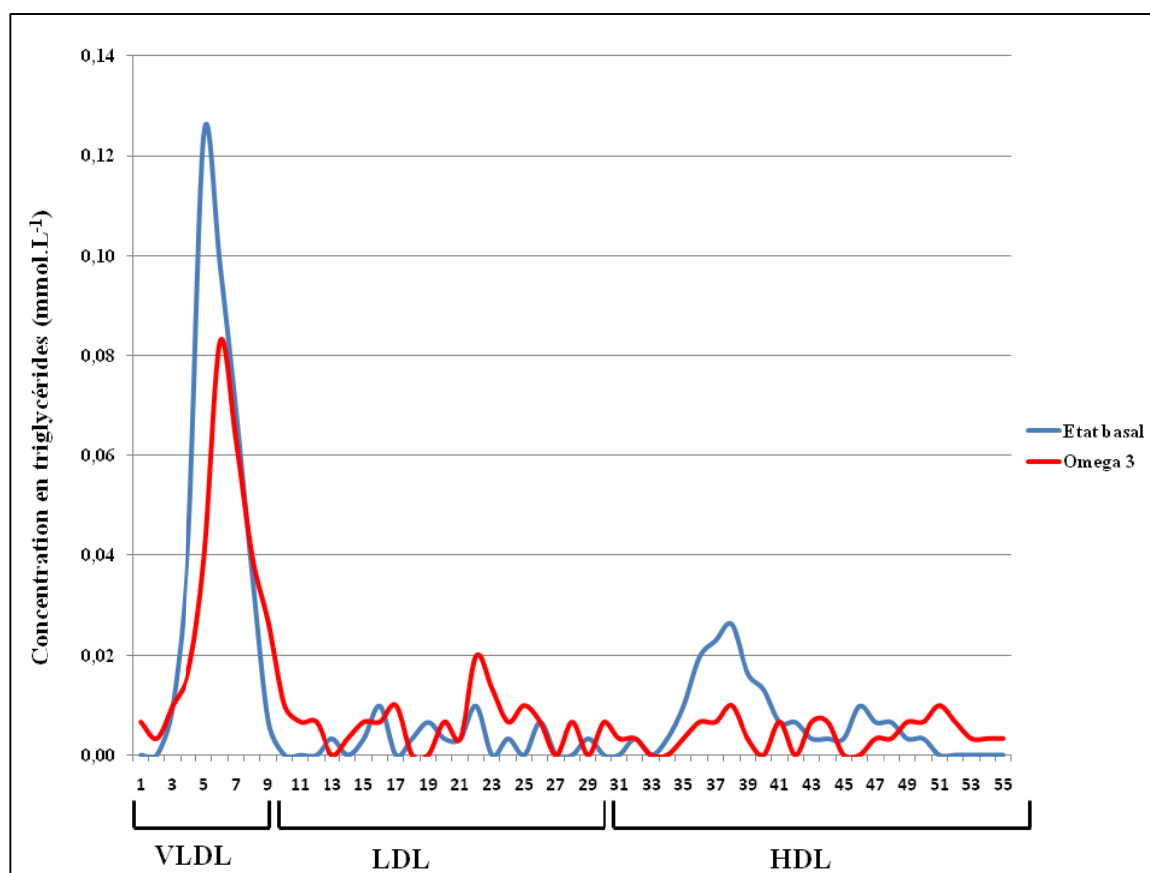


Figure 21 : Concentration en triglycérides dans les différentes lipoprotéines après séparation sur FPLC avant et à la fin de la période de supplémentation. Les lipoprotéines sont éluées en fonction de leur densité, les particules les plus grosses (i.e. les moins denses, VLDL) étant éluées en premier tandis que les particules les plus petites (i.e. les plus denses, HDL) sont éluées en dernier. Fractions 1 à 10 : VLDL, fractions 11 à 29 : LDL, Fractions 30 à 55 : HDL.

Enfin, la figure 22 résume les modifications observées dans l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le TIC. Nous observons une augmentation de l'expression hépatique du PPAR α et de l'ABCA1, alors que celle du SR-BI n'est pas modifiée par la supplémentation.

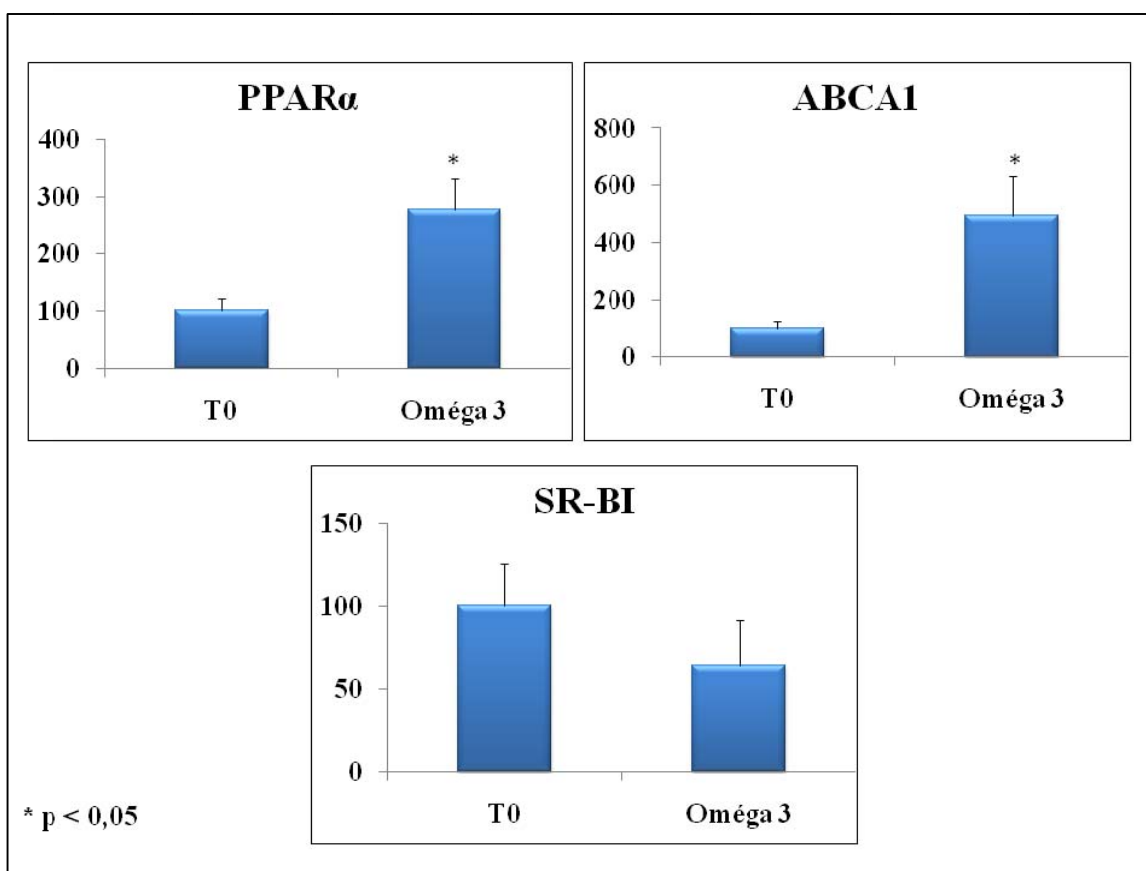


Figure 22 : Expression relative des ARNm du PPAR α , de l'ABCA1 et du SR-BI avant et à la fin de la période de supplémentation. * p < 0,05.

L'ensemble de ces résultats seront à compléter avec les analyses des paramètres cinétiques du cholestérol et de l'apoAI actuellement en cours de modélisation, ainsi qu'avec les mesures d'efflux de cholestérol *in vitro* sur des cellules Fu5AH.

VI.4 Discussion

Il est intéressant de noter que la supplémentation en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ a permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline, sans modification du poids, de la composition corporelle ou de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés, différents facteurs influençant fortement la sensibilité à l'insuline. Cette amélioration de la sensibilité à l'insuline peut s'expliquer par les effets hypolipidémiques de l'EPA et du DHA, mais également par leurs effets potentiels sur l'inflammation et la fluidité membranaire (cf. article N°3). De plus, l'EPA et le DHA sont reconnus comme des activateurs du PPAR γ , récepteur nucléaire aux propriétés insulino-sensibilisatrices. Cet effet sur la sensibilité à l'insuline prouve donc que les acides gras polyinsaturés $\omega 3$ peuvent prévenir l'apparition de l'insulinorésistance, mais également avoir des effets bénéfiques dès lors que celle-ci est installée.

Notre étude montre une baisse de la triglycéridémie à un niveau en accord avec la littérature (-22% environ) (Harris, 1997b, Harris, 1997a). Cette réduction s'explique par une réduction des VLDL-TG, elle-même due à une moindre production hépatique (Ouguerram et al., 2006). Nous observons également une diminution des HDL-TG, ce qui est en accord avec la plus forte densité des HDL observée après séparation sur FPLC. En effet, les HDL riches en triglycérides ont été décrites comme étant des particules de grande taille en comparaison des HDL normales (Rye et al., 1995). Il est donc normal d'observer une augmentation de la densité des particules (soit une réduction de la taille) en parallèle de la réduction des triglycérides au sein de ces particules. Cette transformation est contraire à celle décrite chez l'Homme (Mori et al., 2000), chez qui des HDL de grande taille ont été observés après une supplémentation. L'analyse des études cinétiques permettra d'évaluer le taux d'estérification du cholestérol, autre phénomène pouvant favoriser une augmentation de la densité des lipoprotéines.

En ce qui concerne le cholestérol, nous observons une diminution de la cholestérolémie, expliquée par une baisse du LDL-cholestérol. Cet effet n'est pas retrouvé dans la littérature, mais dans la mesure où cette étude est la première à utiliser le chien obèse dyslipidémique comme modèle, l'utilisation de ce modèle original ne permet pas la comparaison des résultats. Enfin, nous montrons une augmentation de l'expression hépatique de l'ABCA1, alors que celle du SR-BI n'est pas modifiée. Il peut donc y avoir une modification de l'efflux de cholestérol du fait de la supplémentation, mais il semblerait que la capture sélective du cholestérol ne soit pas

modifiée. Cependant, il est impossible de conclure à la vue des résultats partiels obtenus. Les études cinétiques de renouvellement de l'apoAI et du cholestérol ainsi que les mesures d'efflux *in vitro* à venir permettront d'évaluer l'ensemble du TIC et de déterminer plus précisément les effets des AGPI ω 3 sur le métabolisme du cholestérol chez le chien.

Comme discuté dans l'article n°3, l'apport en EPA et DHA peut être questionnable en ce qui concerne le niveau de supplémentation. Le choix d'un apport élevé a été discuté préalablement, mais celui-ci peut avoir eu comme conséquence une exacerbation des modifications du métabolisme du cholestérol. Il faudra donc relativiser les résultats obtenus à l'issue des analyses de cinétiques et se rappeler qu'il s'agit davantage d'une étude pharmacologique que d'une étude nutritionnelle.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'obésité est un problème préoccupant de santé publique, notamment du fait de l'accroissement du risque cardiovasculaire associé. Une surcharge pondérale, même légère, constitue en effet un facteur de risque pour le développement de plusieurs maladies chroniques tel que l'athérosclérose, le diabète de type 2, l'hypertension et certaines formes de cancer. Des changements du comportement alimentaire et la pratique régulière d'un exercice physique semble suffisants pour ralentir considérablement l'apparition de ces perturbations. Etant donné que ces deux solutions sont difficilement applicables dans notre mode de vie occidental, et spécialement chez les patients obèses, des approches pharmaceutiques ou nutritionnelles sont donc indispensables afin de réduire l'incidence des différentes maladies cardiovasculaires chez les obèses, au 1^{er} rang desquelles l'athérosclérose.

Cette thèse avait deux objectifs. Dans une première partie, il s'agissait de caractériser plus précisément notre modèle de chien obèse et insulino-résistant en étudiant d'un point de vue dynamique les effets d'un régime gras sur l'installation de l'obésité. Nous avons également voulu caractériser les différences métaboliques entre tissu adipeux viscéral et tissu adipeux sous-cutané, en ayant comme objectif la compréhension du lien entre obésité viscérale et résistance à l'insuline. Enfin, nous avons également voulu moduler les perturbations métaboliques associées à l'insulino-résistance par une approche nutritionnelle en réalisant une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga 3.

Le deuxième objectif de ce travail a été de comprendre la relation entre triglycéridémie et transport inverse du cholestérol, dans une situation d'absence de CETP, en utilisant le chien obèse comme modèle d'étude. Pour cela, deux molécules hypotriglycéridémiantes ayant des effets variables sur la cholestérolémie ont été utilisées (acide nicotinique et acide gras polyinsaturés oméga 3). Les effets de la baisse des triglycérides plasmatiques sur le transport inverse du cholestérol ont été déterminés grâce au marquage simultané du cholestérol et des apolipoprotéines, suivi de l'analyse des variations biodynamiques d'anabolisme et de catabolisme des HDL.

Tableau 12 : tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la 1^{ère} partie de cette thèse.

Article	But principal	Résultats majeurs
<u>Article 1</u>	Etudier l'installation de l'obésité d'une manière dynamique sur un grand nombre de chien (n=24)	<p>L'obésité s'accompagne d'une insulino-résistance. Il existe une grande variabilité inter-individuelle en ce qui concerne :</p> <ul style="list-style-type: none"> • La prise de poids • La durée nécessaire à la stabilisation d'un poids obèse • Les besoins énergétiques du chien obèse
<u>Article 2</u>	<p>Etudier les différences métaboliques entre tissu adipeux viscéral et sous-cutané en ce qui concerne :</p> <ul style="list-style-type: none"> • La composition en acides gras • Les marqueurs de l'inflammation et de l'hyppoxie • L'expression de gènes du métabolisme lipido-glucidique 	<p>En comparaison du tissu adipeux sous-cutané, le tissu adipeux viscéral :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Est plus riche en acides gras saturés • Est moins riche en acides gras monoinsaturés • Exprime à un niveau plus élevé les marqueurs de l'inflammation et de l'hyppoxie <p>Ces différences peuvent participer à la plus grande insulino-résistance du tissu adipeux viscéral, et potentiellement affecter le foie dans le cadre de la théorie portale.</p>
<u>Article 3</u>	Etudier les effets d'une supplémentation en EPA et DHA sur la sensibilité à l'insuline, le métabolisme lipido-glucidique et la composition en acides gras des tissus	<p>La supplémentation a permis :</p> <ul style="list-style-type: none"> • D'améliorer la dyslipidémie, notamment par une activation de l'expression du PPARα, et par une inhibition de celle du SREBP-1c. • D'améliorer la sensibilité à l'insuline, sans modification du poids, du pourcentage de masse grasse ou de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés, mais en augmentant l'expression du PPARγ, récepteur nucléaire aux effets insulinosensibilisants. • D'accroître la proportion de l'EPA et du DHA dans le foie et le muscle, phénomène pouvant participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Caractérisation du modèle (tableau 12)

Dans une première étude (article 1), nous avons montré qu'un régime hyperlipidique et hyperénergétique induit chez le chien une prise de poids rapide. De plus, la phase de prise de poids peut être divisée en deux parties distinctes, une première de gain de poids rapide suivie d'une deuxième durant laquelle la prise de poids se fait de manière moindre. La prise de poids rapide et directe montre qu'il n'existe pas d'adaptation du métabolisme à la surcharge énergétique. En effet, nous aurions pu observer des modifications de la dépense énergétique ou de la prise alimentaire des animaux afin de limiter la prise de poids. A la vue de nos résultats, il semble qu'aucune adaptation n'ait eu lieu chez les chiens. Ce résultat souligne également l'importance d'une prise en charge rapide de la prise de poids car tout délai dans cette prise en charge augmenterait le risque d'installation à long terme de l'obésité.

Nous confirmons également l'association entre obésité et insulino-résistance chez le chien comme décrit précédemment (Gayet et al., 2004a, Bailhache et al., 2003a), mais le principal résultat de cette étude est probablement la très grande variabilité interindividuelle en ce qui concerne la prise de poids, le temps nécessaire à la stabilisation d'un poids obèse, ou bien encore les besoins énergétiques du chien obèse. Cette variabilité, probablement due, du moins en partie, à une variabilité génétique, peut être une explication partielle du manque d'effet des régimes hypoénergétiques chez le chien (Laflamme et al., 1997) et doit donc être prise en compte lors de la gestion de la perte de poids par une approche nutritionnelle. Cependant, il apparaît nécessaire de comprendre cette variabilité. En effet, il serait intéressant de mesurer l'expression et l'activité de certaines adipokines telles que la leptine, l'adiponectine ou la ghréline afin d'étudier leur implication dans la prise de poids mais également dans la variabilité mise en évidence. Il faudrait également déterminer l'existence ou non d'une telle variabilité dans la dépense énergétique du chien obèse qui pourrait en partie expliquer nos résultats.

La littérature décrit le tissu adipeux viscéral comme étant plus impliqué dans certaines pathologies que le tissu adipeux sous-cutané (Lafontan and Girard, 2008). Partant de ce constat, nous avons voulu caractériser des différences métaboliques entre ces deux tissus adipeux dans une situation d'obésité et d'insulino-résistance (article 2). Nous avons montré que le tissu adipeux viscéral se caractérise par une teneur en acides gras saturés plus élevée, une plus grande

Tableau 13 : tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la 2^{ème} partie de cette thèse.

Article	But principal	Résultats majeurs
<p><u>Article 4 et 5</u></p>	<p>Etude pharmacologique visant à caractériser les effets de l'acide nicotinique sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines, et à proposer des mécanismes potentiellement impliqués</p>	<p>Le traitement à l'acide nicotinique a eu pour conséquences :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Une aggravation de l'insulinorésistance • Une amélioration très nette de la dyslipidémie (baisse des concentrations plasmatiques en triglycérides et apoB100 dans les VLDL), qui s'explique par une réduction de la synthèse endogène de triglycérides, secondaire à la réduction de l'expression de la DGAT2 • Une réduction des concentrations plasmatiques en HDL-cholestérol et apoAI <ul style="list-style-type: none"> • Ce sont des effets contraires à ceux observés chez l'Homme, qui montrent toute l'importance de la CETP dans les effets pharmacologiques de l'acide nicotinique • Nous mettons en évidence des effets indépendants de la CETP (augmentation de l'efflux de cholestérol in vitro, de l'estérification du cholestérol et de la capture sélective des esters de cholestérol) qui peuvent suggérer un transport inverse du cholestérol plus actif
<p>Article 6 <i>Résultats préliminaires</i></p>	<p>Etudier les impacts d'une supplémentation en EPA et DHA sur le transport inverse du cholestérol chez le chien</p>	<p>Résultats préliminaires obtenus à ce jour :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la concentration plasmatique en triglycérides et LDL-cholestérol, pas de modification de celle en HDL-cholestérol • Réduction de la taille moyenne des particules HDL : particules plus denses en accord avec la réduction de la teneur en triglycéride des HDL • Augmentation de l'expression de l'ABCA1 : possible augmentation de l'efflux <p>Pas de changement de l'expression du SR-BI : capture sélective des esters de cholestérol n'est peut être pas modifiée par la supplémentation</p>

insulinorésistance, ainsi que par un niveau d'expression de marqueurs de l'inflammation et de l'hypoxie plus important. En se basant sur l'hypothèse portale selon laquelle le tissu adipeux viscéral relargue directement son contenu dans la veine porte (Kabir et al., 2005), on peut émettre l'hypothèse que la plus grande pathogénicité du tissu adipeux viscéral soit due à sa position anatomique mais également à une composition en acides gras, adipokines et autres marqueurs pouvant directement affecter le foie. Cette hypothèse reste cependant à confirmer d'un point de vue mécanistique. L'impossibilité de prélever régulièrement et directement dans la circulation portale limite les possibilités d'investigations. Cependant, l'étude présentée dans l'article 2 doit être réalisée parallèlement à l'état sain et à l'état obèse afin de caractériser les effets de l'obésité sur ces caractéristiques du tissu adipeux viscéral. De plus, nos résultats suggèrent qu'une modification de l'inflammation ou de l'hypoxie, ou encore de la composition en acides gras du tissu adipeux viscéral pourrait être bénéfique au niveau du foie.

Il nous a donc paru intéressant de chercher à moduler nutritionnellement les différents paramètres du syndrome métabolique, notamment au niveau du tissu adipeux viscéral, par une supplémentation en acides gras polyinsaturés oméga 3 (article 3). Celle-ci a permis d'améliorer les concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol total et LDL-cholestérol, notamment du fait de l'activation du PPAR α et de la répression du SREBP-1c. Nos résultats concernant le cholestérol apparaissent comme originaux par rapport à la littérature qui décrit une absence d'effet de l'EPA et du DHA sur le cholestérol. Cependant, notre modèle de chien obèse et insulinorésistant est un modèle original, et de ce fait les comparaisons avec les études menées chez l'Homme ou chez d'autres espèces animales sont difficiles.

Contrairement aux effets hypotriglycémisants bien connus, les effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur l'insulinorésistance sont contradictoires (Delarue et al., 2004). L'un des buts de cette étude était de les évaluer dans un modèle validé pour l'étude de l'insulinorésistance en utilisant la méthode de mesure de référence, le clamp euglycémique hyperinsulinémique (Radziuk, 2000). Dans ces conditions, nous avons montré que l'EPA et le DHA sont capables d'améliorer la sensibilité à l'insuline, en partie du fait d'une augmentation de l'expression du PPAR γ , facteur de transcription connu pour ses effets insulinosensibilisants (Rangwala and Lazar, 2004). De plus, nous observons une accumulation d'EPA et de DHA dans les tissus, notamment dans le foie et le muscle, deux tissus de première importance dans la

modulation de la sensibilité à l'insuline. Ces résultats peuvent suggérer un lien direct entre AGPI et sensibilité à l'insuline, notamment par une modification de la fluidité membranaire (Kamada et al., 1986) et de l'efficacité de la voie de signalisation à l'insuline (McCallum and Epanand, 1995). Les résultats obtenus au niveau des tissus adipeux vont aussi dans ce sens. En effet, l'accroissement conjoint dans le tissu adipeux sous-cutané de la teneur en EPA/DHA et de l'expression de GLUT4, marqueur de la sensibilité à l'insuline, sont cohérents avec cette hypothèse, de même que l'absence de variations de ces paramètres dans le tissu adipeux viscéral. Cette relation entre acides gras polyinsaturés et sensibilité à l'insuline reste cependant à confirmer ou infirmer. Des études plus précises de la voie de signalisation de l'insuline associées à l'analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires pourraient améliorer notre compréhension de cette relation. Cette étude montre aussi des effets différents de la supplémentation sur le tissu adipeux en fonction de sa localisation. Il serait donc intéressant de poursuivre les investigations dans ce sens, afin de mettre en place des approches nutritionnelles capables d'influer sur le métabolisme adipeux, notamment au niveau viscéral.

Etude du transport inverse du cholestérol (tableau 13)

Le TIC a été caractérisé comme étant une voie anti-athérogénique et représente donc une cible thérapeutique intéressante (Natarajan et al., 2010). En effet, tout traitement entraînant une hausse de l'efficacité du TIC pourrait potentiellement réduire le risque cardiovasculaire. Dans cette perspective, nous avons évalué les effets sur le TIC de deux molécules hypotriglycéridémiantes, l'acide nicotinique et les acides gras polyinsaturés oméga 3.

Un premier protocole nous a permis d'évaluer les effets de l'acide nicotinique à doses pharmacologiques sur l'ensemble du métabolisme des lipoprotéines (article 4 et 5). Nous avons confirmé les effets hypotriglycéridémiants et hypocholestérolémiants de l'acide nicotinique. Nous avons également montré que la réduction des VLDL était due à une réduction de la synthèse d'apoB100. Il n'y a en revanche aucune modification de l'expression de la MTP et donc de l'assemblage des VLDL. Nous observons une réduction de l'expression hépatique de la DGAT2 ce qui souligne, pour la première fois *in vivo*, un effet important de l'acide nicotinique

sur la synthèse hépatique de triglycérides. Cette étude montre le rôle majeur de cette enzyme dans la régulation de la triglycéridémie, et confirme son intérêt en tant que cible thérapeutique. Des études sont actuellement en cours afin de pouvoir proposer dans l'avenir des inhibiteurs pharmacologiques de la DGAT2.

Ce protocole nous a également permis d'évaluer les effets de l'acide nicotinique sur le TIC. Le choix du chien comme modèle d'étude a résidé dans le fait que cet animal est dépourvu de CETP. Or, cette protéine a été suspectée comme étant au centre du mécanisme conduisant à une hausse du HDL-cholestérol après traitement à l'acide nicotinique (van der Hoorn et al., 2008). En parallèle d'une étude similaire menée chez l'homme, cette étude chez le chien nous permet donc de nous affranchir de la CETP afin d'évaluer son implication. La baisse du HDL-cholestérol dans notre étude apparaît être contraire à la littérature, mais confirme bien toute l'importance de la CETP dans les effets observés chez l'Homme. Cependant, nous montrons que l'acide nicotinique possède d'autres effets indépendants de la CETP, tel qu'une activation de l'efflux de cholestérol ainsi que de son esterification. Associé avec un catabolisme des HDL plus rapide, nous montrons donc que, chez le chien, l'AN favorise le TIC. Ces effets pourraient avoir été masqués chez l'Homme du fait de l'importance des transferts via la CETP dans le métabolisme des HDL, et pourraient participer à la réduction du risque cardiovasculaire observé lors d'un traitement à l'AN. Les effets de l'acide nicotinique sur le renouvellement du cholestérol n'ont à ce jour jamais été évalués chez l'Homme. Il sera donc intéressant de comparer les résultats de notre étude avec ceux du protocole actuellement mené chez des patients hypertriglycéridémiques, afin de valider l'existence d'effets indépendants de la CETP ainsi que confirmer l'amélioration du TIC suite à un traitement à l'acide nicotinique.

La dernière partie de cette thèse était axée sur les acides gras polyinsaturés ω 3 et leurs impacts sur le TIC. Nous montrons que la supplémentation en EPA et DHA a eu pour effet de rendre les HDL plus denses, notamment du fait d'une teneur réduite en triglycérides. La supplémentation a eu également pour effet d'augmenter l'expression de l'ABCA1 dans le foie, alors que celle de SR-BI n'a pas été modifiée. Cependant, du fait du caractère encore partiel des résultats obtenus, il est impossible de conclure actuellement sur les effets des acides gras polyinsaturés ω 3 sur le TIC. L'analyse des cinétiques d'apoAI et de cholestérol actuellement en cours, ainsi que les mesures d'efflux *in vitro*, permettront probablement d'apporter de nouvelles

perspectives. Cependant, les résultats d'ores et déjà obtenus apparaissent prometteurs et nous pouvons supposer que le TIC chez le chien ait été amélioré par les acides gras polyinsaturés oméga 3.

Réflexion sur ce travail

Le choix du modèle animal

Il est, pour des raisons éthiques évidentes, impossible d'étudier les mécanismes sous-jacents de l'obésité directement chez l'Homme. De plus, les études clinique menée chez l'Homme comportent de nombreuses limites telles que l'hétérogénéité des groupes de patients, l'absence d'historique de la surcharge pondérale ou encore les difficultés à contrôler le régime alimentaire. L'étude de l'obésité et de ses conséquences pathologiques a donc nécessité l'établissement d'un modèle animal adapté. Les modèles d'origine génétique ont été très intéressants par le passé, mais leur caractère réductionniste représente un inconvénient majeur. De plus, l'obésité humaine est en grande partie due aux habitudes nutritionnelles, facteur absent dans les études sur ces modèles génétiques.

A l'inverse, le chien est un bon modèle pour l'étude de l'obésité dans le sens où celle-ci peut être induite facilement à l'aide de manipulations diététiques. D'autres espèces (rat, souris, hamster) présentent également cet avantage mais, du fait d'une prise de poids très rapide, les études menées sur ces animaux ne miment pas au mieux l'installation lente de l'obésité chez l'Homme. Le chien représente donc un modèle de choix, combinant de nombreux avantages : durée de vie, facilité d'expérimentation, manipulation aisée du régime, etc. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur cette espèce. De plus, l'insulinorésistance associée à l'obésité chez cet animal a été décrite comme induisant les mêmes perturbations que celles observées chez l'Homme.

Le modèle canin présente toutefois deux inconvénients majeurs : l'absence de CETP et la prépondérance des HDL comme transporteur de cholestérol. Celles-ci peuvent apparaître comme des facteurs limitant des études de la dyslipidémie associée à l'obésité dans la mesure où il s'agit là de différences critiques avec l'Homme. Il est donc important de mener, en parallèle des études sur le chien, des études identiques soit sur un modèle animal ne présentant pas ces inconvénients

(lapin, hamster), soit directement chez l'Homme, ce qui est le cas des études portant sur l'acide nicotinique. Les résultats acquis chez le chien pourraient ainsi être mis en parallèle avec ceux obtenus sur d'autres modèles, ce qui augmenterait l'impact des conclusions obtenues et faciliterait ainsi leur publication.

Le choix du régime

Tout comme le choix du modèle animal, les caractéristiques du régime utilisé pour induire l'obésité sont essentielles. Il ne pouvait s'agir dans notre étude que d'un régime riche en gras car le but premier était l'obtention d'animaux obèses. Comme discuté précédemment, la part des lipides dans l'apport énergétique était de 42%, ce qui est cohérent par rapport aux mesures effectuées chez l'Homme par des études épidémiologiques (environ 38-39% de calories lipidiques).

A l'inverse, le niveau de suralimentation est plus questionnable. Les animaux ont ingéré quotidiennement 2,2 fois leurs besoins d'entretien, ce qui est important. Ce niveau d'apport reste envisageable chez l'Homme, mais doit être néanmoins anecdotique dans la réalité. Notre choix résulte d'un compromis entre la cohérence physiologique du régime et le temps nécessaire à l'établissement de l'obésité. Une suralimentation plus modérée, donc plus physiologique, aurait induit une durée expérimentale nettement plus longue et difficilement compatible avec la conduite d'une thèse. Le choix que nous avons effectué pour ces travaux reste donc élevé en termes de calories ingérées par jour, et doit être pris en considération pour établir certaines conclusions.

Le choix de la supplémentation en EPA et DHA

L'apport en EPA et DHA (920 mg et 760 mg par jour respectivement) apparaît être élevé en comparaison des recommandations faites chez l'Homme (250 mg par jour pour chaque acide gras). Ce point a déjà été discuté au niveau de l'article n°3. Il faut néanmoins relativiser les résultats obtenus en rapport avec cette supplémentation. Il est tout à fait possible qu'une supplémentation à un niveau plus nutritionnel n'ait pas eu les mêmes effets, notamment en ce qui

concerne la sensibilité à l'insuline. Cette nuance sera également à prendre en compte lors de l'analyse des résultats des études cinétiques du renouvellement des lipoprotéines.

Intérêt de l'approche cinétique par marquage aux isotopes stables

La technique utilisée pour l'étude du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines est probablement l'une des originalités de ce travail. En effet, bien que cette technique soit coûteuse, compliquée et demandant un temps de manipulation important, les résultats obtenus permettent de réellement étudier le métabolisme du cholestérol. Les analyses biochimiques classiques des lipides plasmatiques fournissent peu de renseignements et apportent une vue statique de la situation. La technique de marquage du cholestérol et des apolipoprotéines permet un suivi précis de chaque classe de lipoprotéine, mais avant tout, permet d'obtenir une vue dynamique des phénomènes plasmatiques. Ce point de vue dynamique est de première importance pour la compréhension des perturbations plasmatiques associées à l'obésité, mais aussi des mécanismes d'action des molécules hypolipémiants.

Perspectives

Le travail présenté dans cette thèse nous a permis de mieux caractériser notre modèle animal, aussi bien au niveau de la prise de poids qu'en ce qui concerne l'implication du tissu adipeux viscéral, de l'hypoxie et de l'inflammation du tissu adipeux dans la relation entre obésité et insulino-résistance. Nous avons également montré la qualité du modèle canin pour des études pharmacologiques ou nutritionnelles de modulation du TIC. Cependant, les résultats obtenus ouvrent la voie à de nouvelles études, que ce soit dans la compréhension du lien entre obésité et insulino-résistance ou dans la modulation du TIC.

Nous avons suggéré toute l'importance des acides gras et du tissu adipeux viscéral dans l'établissement de l'insulino-résistance. Il serait intéressant de poursuivre dans cette voie, notamment pour établir clairement le lien entre tissu adipeux viscéral et insulino-résistance hépatique. Il est également nécessaire de prendre en compte la nature des acides gras dans les études à venir. En effet, nous avons montré que les acides gras saturés pouvaient avoir un effet

délétère direct sur le foie, alors que les acides gras polyinsaturés oméga 3 pouvaient améliorer la sensibilité à l'insuline. La compréhension des mécanismes impliqués pourrait permettre d'ouvrir la voie à de nouvelles approches nutritionnelles des problèmes d'insulinorésistance. Il serait par exemple intéressant d'évaluer les effets d'une modification de la composition en acides gras de la membrane plasmique suite à une supplémentation en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ sur l'ensemble de la signalisation insulinique aussi bien dans le foie que dans le muscle.

Enfin, nos résultats ainsi que l'ensemble de la littérature suggèrent une forte implication de l'hypoxie et de l'inflammation dans l'insulinorésistance du tissu adipeux. Dans la mesure où notre modèle animal est un bon modèle d'étude de l'insulinorésistance et que les prélèvements de tissu adipeux sont possibles, il serait intéressant de chercher à comprendre la relation entre hypoxie/inflammation et insulinorésistance lors de la phase de prise de poids et d'initiation de l'insulinorésistance. Toute approche nutritionnelle visant à réduire l'inflammation du tissu adipeux peut être potentiellement intéressante. On peut par exemple penser aux AGPI $\omega 3$ et à leurs effets anti-inflammatoires des eicosanoïdes, mais également aux différents polyphénols issus des diverses plantes qui pourraient, via leurs actions anti-oxydantes, moduler le niveau inflammatoire du tissu adipeux.

Enfin, nous avons montré que le chien était un bon modèle pour l'étude des perturbations du métabolisme des lipoprotéines et de leurs corrections. Cependant, l'absence de CETP chez le chien limite l'intérêt des investigations. Les résultats obtenus dans ce modèle pourraient cependant être complémentaires de ceux obtenus chez l'homme ou chez une autre espèce animale possédant la CETP, tel que le hamster par exemple. Dans ces conditions, les nouveaux traitements actuellement en cours de développement pourraient ainsi être évalués chez le chien. On peut ainsi penser aux inhibiteurs de la DGAT2, dont notre étude a souligné toute l'importance. Puisque le chien a été décrit comme un bon modèle d'étude des agonistes des PPARs, les glitazars, doubles agonistes du PPAR α et du PPAR γ , pourraient également être étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Acton, S.; Rigotti, A.; Landschulz, K. T.; Xu, S.; Hobbs, H. H.; Krieger, M., 1996: Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, **271**, 518-520.
- Acton, S. L.; Scherer, P. E.; Lodish, H. F.; Krieger, M., 1994: Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*, **269**, 21003-21009.
- Agellon, L. B.; Walsh, A.; Hayek, T.; Moulin, P.; Jiang, X. C.; Shelanski, S. A.; Breslow, J. L.; Tall, A. R., 1991: Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem*, **266**, 10796-10801.
- Ahima, R. S.; Flier, J. S., 2000: Leptin. *Annu Rev Physiol*, **62**, 413-437.
- Aktories, K.; Jakobs, K. H.; Schultz, G., 1980: Nicotinic acid inhibits adipocyte adenylate cyclase in a hormone--like manner. *FEBS Lett*, **115**, 11-14.
- Alaupovic, P.; Mack, W. J.; Knight-Gibson, C.; Hodis, H. N., 1997: The role of triglyceride-rich lipoprotein families in the progression of atherosclerotic lesions as determined by sequential coronary angiography from a controlled clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 715-722.
- Albert, C. M.; Hennekens, C. H.; O'Donnell, C. J.; Ajani, U. A.; Carey, V. J.; Willett, W. C.; Ruskin, J. N.; Manson, J. E., 1998: Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, **279**, 23-28.
- Alberti, K. G.; Zimmet, P.; Shaw, J., 2006: Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, **23**, 469-480.
- Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z., 1998: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, **15**, 539-553.
- Alexander, E. T.; Bhat, S.; Thomas, M. J.; Weinberg, R. B.; Cook, V. R.; Bharadwaj, M. S.; Sorci-Thomas, M., 2005: Apolipoprotein A-I helix 6 negatively charged residues attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) reactivity. *Biochemistry*, **44**, 5409-5419.
- Altmann, S. W.; Davis, H. R., Jr.; Zhu, L. J.; Yao, X.; Hoos, L. M.; Tetzloff, G.; Iyer, S. P.; Maguire, M.; Golovko, A.; Zeng, M.; Wang, L.; Murgolo, N.; Graziano, M. P., 2004: Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, **303**, 1201-1204.
- Altschul, R.; Hoffer, A.; Stephen, J. D., 1955: Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem*, **54**, 558-559.
- Arai, T.; Wang, N.; Bezouevski, M.; Welch, C.; Tall, A. R., 1999: Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J Biol Chem*, **274**, 2366-2371.
- Austin, M. A.; Rodriguez, B. L.; McKnight, B.; McNeely, M. J.; Edwards, K. L.; Curb, J. D.; Sharp, D. S., 2000: Low-density lipoprotein particle size, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol as risk factors for coronary heart disease in older Japanese-American men. *Am J Cardiol*, **86**, 412-416.
- Babcock, T. A.; Novak, T.; Ong, E.; Jho, D. H.; Helton, W. S.; Espot, N. J., 2002: Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor-alpha production by omega-3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10. *J Surg Res*, **107**, 135-139.

- Babitt, J.; Trigatti, B.; Rigotti, A.; Smart, E. J.; Anderson, R. G.; Xu, S.; Krieger, M., 1997: Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem*, **272**, 13242-13249.
- Badimon, J. J.; Badimon, L.; Fuster, V., 1990: Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*, **85**, 1234-1241.
- Bagga, D.; Wang, L.; Farias-Eisner, R.; Glaspy, J. A.; Reddy, S. T., 2003: Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1751-1756.
- Bailhache, E.; Briand, F.; Nguyen, P.; Krempf, M.; Magot, T.; Ouguerram, K., 2004: Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest*, **34**, 527-534.
- Bailhache, E.; Nguyen, P.; Krempf, M.; Siliart, B.; Magot, T.; Ouguerram, K., 2003a: Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism*, **52**, 559-564.
- Bailhache, E.; Ouguerram, K.; Gayet, C.; Krempf, M.; Siliart, B.; Magot, T.; Nguyen, P., 2003b: 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**, 86-95.
- Balistreri, C. R.; Caruso, C.; Candore, G., 2010: The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, **2010**, 802078.
- Balkau, B.; Charles, M. A., 1999: Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*, **16**, 442-443.
- Balkau, B.; Vernay, M.; Mhamdi, L.; Novak, M.; Arondel, D.; Vol, S.; Tichet, J.; Eschwege, E., 2003: The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab*, **29**, 526-532.
- Barrie, J.; Nash, A. S.; Watson, T. D. G., 1993: Quantitative analysis of canine plasma lipoproteins. *J Small An Pract*, **34**, 226-231.
- Barter, P. J.; Caulfield, M.; Eriksson, M.; Grundy, S. M.; Kastelein, J. J.; Komajda, M.; Lopez-Sendon, J.; Mosca, L.; Tardif, J. C.; Waters, D. D.; Shear, C. L.; Revkin, J. H.; Buhr, K. A.; Fisher, M. R.; Tall, A. R.; Brewer, B., 2007: Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*, **357**, 2109-2122.
- Batista, M. C.; Welty, F. K.; Diffenderfer, M. R.; Sarnak, M. J.; Schaefer, E. J.; Lamon-Fava, S.; Asztalos, B. F.; Dolnikowski, G. G.; Brousseau, M. E.; Marsh, J. B., 2004: Apolipoprotein A-I, B-100, and B-48 metabolism in subjects with chronic kidney disease, obesity, and the metabolic syndrome. *Metabolism*, **53**, 1255-1261.
- Baynes, C.; Henderson, A. D.; Anyaoku, V.; Richmond, W.; Hughes, C. L.; Johnston, D. G.; Elkeles, R. S., 1991: The role of insulin insensitivity and hepatic lipase in the dyslipidaemia of type 2 diabetes. *Diabet Med*, **8**, 560-566.
- Belfiore, A.; Frasca, F.; Pandini, G.; Sciacca, L.; Vigneri, R., 2009: Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*, **30**, 586-623.
- Beltz, W. F.; Kesaniemi, Y. A.; Howard, B. V.; Grundy, S. M., 1985: Development of an integrated model for analysis of the kinetics of apolipoprotein B in plasma very low

- density lipoproteins, intermediate density lipoproteins, and low density lipoproteins. *J Clin Invest*, **76**, 575-585.
- Bergman, R. N.; Kim, S. P.; Catalano, K. J.; Hsu, I. R.; Chiu, J. D.; Kabir, M.; Hucking, K.; Ader, M., 2006: Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*, **14 Suppl 1**, 16S-19S.
- Billiar, T. R.; Bankey, P. E.; Svingen, B. A.; Curran, R. D.; West, M. A.; Holman, R. T.; Simmons, R. L.; Cerra, F. B., 1988: Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery*, **104**, 343-349.
- Bloomfield, D.; Carlson, G. L.; Sapre, A.; Tribble, D.; McKenney, J. M.; Littlejohn, T. W., 3rd; Sisk, C. M.; Mitchel, Y.; Pasternak, R. C., 2009: Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib as monotherapy and coadministered with atorvastatin in dyslipidemic patients. *Am Heart J*, **157**, 352-360 e352.
- Bluher, S.; Mantzoros, C. S., 2009: Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*, **89**, 991S-997S.
- Blum, C. B.; Levy, R. I.; Eisenberg, S.; Hall, M., 3rd; Goebel, R. H.; Berman, M., 1977: High density lipoprotein metabolism in man. *J Clin Invest*, **60**, 795-807.
- Boden, G.; Chen, X.; Ruiz, J.; White, J. V.; Rossetti, L., 1994: Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*, **93**, 2438-2446.
- Boden, W. E., 2000: 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*, **86**, 19L-22L.
- Bodzioch, M.; Orso, E.; Klucken, J.; Langmann, T.; Bottcher, A.; Diederich, W.; Drobnik, W.; Barlage, S.; Buchler, C.; Porsch-Ozcurumez, M.; Kaminski, W. E.; Hahmann, H. W.; Oette, K.; Rothe, G.; Aslanidis, C.; Lackner, K. J.; Schmitz, G., 1999: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, **22**, 347-351.
- Borggreve, S. E.; De Vries, R.; Dullaart, R. P., 2003: 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*, **33**, 1051-1069.
- Bowman, B. A.; Rusell, R. M., 2001: *Present Knowledge in nutrition. 8th edition*. ILSI press, Washington D.C.
- Brenna, J. T., 2002: Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **5**, 127-132.
- Briand, F.; Bailhache, E.; Andre, A.; Magot, T.; Krempf, M.; Nguyen, P.; Ouguerram, K., 2008: The hyperenergetic-fed obese dog, a model of disturbance of apolipoprotein B-100 metabolism associated with insulin resistance: kinetic study using stable isotopes. *Metabolism*, **57**, 966-972.
- Briand, F.; Bailhache, E.; Nguyen, P.; Krempf, M.; Magot, T.; Ouguerram, K., 2007: Metabolism of high density lipoprotein apolipoprotein A-I and cholesteryl ester in insulin resistant dog: a stable isotope study. *Diabetes Obes Metab*, **9**, 139-142.
- Briand, O.; Lestavel, S.; Pilon, A.; Torpier, G.; Fruchart, J. C.; Clavey, V., 2003: SR-BI does not require raft/caveola localisation for cholesteryl ester selective uptake in the human adrenal cell line NCI-H295R. *Biochim Biophys Acta*, **1631**, 42-50.
- Brown, W. V.; Baginsky, M. L., 1972: Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, **46**, 375-382.

- Brundert, M.; Ewert, A.; Heeren, J.; Behrendt, B.; Ramakrishnan, R.; Greten, H.; Merkel, M.; Rinninger, F., 2005: Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 143-148.
- Brzustowicz, M. R.; Cherezov, V.; Caffrey, M.; Stillwell, W.; Wassall, S. R., 2002: Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation. *Biophys J*, **82**, 285-298.
- Bungert, S.; Molday, L. L.; Molday, R. S., 2001: Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem*, **276**, 23539-23546.
- Burks, D. J.; White, M. F., 2001: IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*, **50 Suppl 1**, S140-145.
- Calder, P. C., 2006: n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, **83**, 1505S-1519S.
- Calvo, D.; Gomez-Coronado, D.; Lasuncion, M. A.; Vega, M. A., 1997: CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2341-2349.
- Cameron, A. J.; Shaw, J. E.; Zimmet, P. Z., 2004: The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **33**, 351-375, table of contents.
- Carlson, L. A., 2005: Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med*, **258**, 94-114.
- Case, L. P.; Carey, D. P.; Hirakawa, D. A.; Daristotle, L., 2000: *Canine and feline nutrition. Second edition*. Mosby, Inc., St. Louis.
- Catapano, A. L., 1982: Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase activity. *Ric Clin Lab*, **12**, 35-40.
- Caughey, G. E.; Mantzioris, E.; Gibson, R. A.; Cleland, L. G.; James, M. J., 1996: The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr*, **63**, 116-122.
- Cavelier, C.; Lorenzi, I.; Rohrer, L.; von Eckardstein, A., 2006: Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 655-666.
- Chambenoit, O.; Hamon, Y.; Marguet, D.; Rigneault, H.; Rosseneu, M.; Chimini, G., 2001: Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem*, **276**, 9955-9960.
- Champagne, E.; Martinez, L. O.; Collet, X.; Barbaras, R., 2006: Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr Opin Lipidol*, **17**, 279-284.
- Chan, D. C.; Watts, G. F.; Nguyen, M. N.; Barrett, P. H., 2006: Factorial study of the effect of n-3 fatty acid supplementation and atorvastatin on the kinetics of HDL apolipoproteins A-I and A-II in men with abdominal obesity. *Am J Clin Nutr*, **84**, 37-43.
- Chan, D. C.; Watts, G. F.; Sussekov, A. V.; Barrett, P. H.; Yang, Z.; Hua, J.; Song, S., 2004: Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. *Diabetes Res Clin Pract*, **63**, 77-85.
- Chandran, M.; Phillips, S. A.; Ciaraldi, T.; Henry, R. R., 2003: Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, **26**, 2442-2450.
- Chapman, M. J., 1986: Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*, **128**, 70-143.

- Chawla, A.; Boisvert, W. A.; Lee, C. H.; Laffitte, B. A.; Barak, Y.; Joseph, S. B.; Liao, D.; Nagy, L.; Edwards, P. A.; Curtiss, L. K.; Evans, R. M.; Tontonoz, P., 2001: A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, **7**, 161-171.
- Chen, C. H.; Albers, J. J., 1986: Stimulation of lecithin:cholesterol acyltransferase activity by apolipoprotein A-II in the presence of apolipoprotein A-I. *Eur J Biochem*, **155**, 589-594.
- Chen, S. H.; Habib, G.; Yang, C. Y.; Gu, Z. W.; Lee, B. R.; Weng, S. A.; Silberman, S. R.; Cai, S. J.; Deslypere, J. P.; Rosseneu, M.; et al., 1987: Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science*, **238**, 363-366.
- Cheng, S. H.; Stanley, M. M., 1959: Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med*, **101**, 223-225.
- Chinetti, G.; Gbaguidi, F. G.; Griglio, S.; Mallat, Z.; Antonucci, M.; Poulain, P.; Chapman, J.; Fruchart, J. C.; Tedgui, A.; Najib-Fruchart, J.; Staels, B., 2000: CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*, **101**, 2411-2417.
- Chinetti, G.; Lestavel, S.; Bocher, V.; Remaley, A. T.; Neve, B.; Torra, I. P.; Teissier, E.; Minnich, A.; Jaye, M.; Duverger, N.; Brewer, H. B.; Fruchart, J. C.; Clavey, V.; Staels, B., 2001: PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*, **7**, 53-58.
- Choi, C. S.; Savage, D. B.; Kulkarni, A.; Yu, X. X.; Liu, Z. X.; Morino, K.; Kim, S.; Distefano, A.; Samuel, V. T.; Neschen, S.; Zhang, D.; Wang, A.; Zhang, X. M.; Kahn, M.; Cline, G. W.; Pandey, S. K.; Geisler, J. G.; Bhanot, S.; Monia, B. P.; Shulman, G. I., 2007: Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*, **282**, 22678-22688.
- Chroni, A.; Liu, T.; Fitzgerald, M. L.; Freeman, M. W.; Zannis, V. I., 2004: Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry*, **43**, 2126-2139.
- Chung, H.; Randolph, A.; Reardon, I.; Henrikson, R. L., 1982: The covalent structure of apolipoprotein A-I from canine high density lipoproteins. *J Biol Chem*, **257**, 2961-2967.
- Clamp, A. G.; Ladha, S.; Clark, D. C.; Grimble, R. F.; Lund, E. K., 1997: The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids*, **32**, 179-184.
- Claudel, T.; Inoue, Y.; Barbier, O.; Duran-Sandoval, D.; Kosykh, V.; Fruchart, J.; Fruchart, J. C.; Gonzalez, F. J.; Staels, B., 2003: Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology*, **125**, 544-555.
- Claudel, T.; Staels, B.; Kuipers, F., 2005: The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2020-2030.
- Claudel, T.; Sturm, E.; Duez, H.; Torra, I. P.; Sirvent, A.; Kosykh, V.; Fruchart, J. C.; Dallongeville, J.; Hum, D. W.; Kuipers, F.; Staels, B., 2002: Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*, **109**, 961-971.
- Clavey, V.; Lestavel-Delattre, S.; Copin, C.; Bard, J. M.; Fruchart, J. C., 1995: Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 963-971.

- Clee, S. M.; Zhang, H.; Bissada, N.; Miao, L.; Ehrenborg, E.; Benlian, P.; Shen, G. X.; Angel, A.; LeBoeuf, R. C.; Hayden, M. R., 1997: Relationship between lipoprotein lipase and high density lipoprotein cholesterol in mice: modulation by cholesteryl ester transfer protein and dietary status. *J Lipid Res*, **38**, 2079-2089.
- Combs, T. P.; Berg, A. H.; Obici, S.; Scherer, P. E.; Rossetti, L., 2001: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*, **108**, 1875-1881.
- Connelly, M. A.; Williams, D. L., 2004: Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol*, **15**, 287-295.
- Costet, P.; Luo, Y.; Wang, N.; Tall, A. R., 2000: Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*, **275**, 28240-28245.
- Cunnane, S. C., 2001: New developments in alpha-linolenate metabolism with emphasis on the importance of beta-oxidation and carbon recycling. *World Rev Nutr Diet*, **88**, 178-183.
- Cunnane, S. C.; Anderson, M. J., 1997: The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr*, **127**, 146-152.
- Czarnecka, H.; Yokoyama, S., 1996: Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J Biol Chem*, **271**, 2023-2028.
- Czernichow, S.; Vergnaud, A. C.; Bruckert, E.; Oppert, J. M.; Bertrais, S.; Paillard, F.; Astorg, P.; Arnault, N.; Galan, P.; Hercberg, S., 2005: Consommation d'huiles et matières grasses en France : relations avec le niveau d'étude et la région de résidence dans la cohorte SU.VI.MAX. *Cah. Nutr. Diét.*, **40**, 254-259.
- D'Alessandro, M. E.; Chicco, A.; Karabatas, L.; Lombardo, Y. B., 2000: Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem*, **11**, 273-280.
- Dallinga-Thie, G. M.; Groenendijk, M.; Blom, R. N.; De Bruin, T. W.; De Kant, E., 2001: Genetic heterogeneity in the apolipoprotein C-III promoter and effects of insulin. *J Lipid Res*, **42**, 1450-1456.
- Dashti, N.; Gandhi, M.; Liu, X.; Lin, X.; Segrest, J. P., 2002: The N-terminal 1000 residues of apolipoprotein B associate with microsomal triglyceride transfer protein to create a lipid transfer pocket required for lipoprotein assembly. *Biochemistry*, **41**, 6978-6987.
- Daveloose, D.; Linard, A.; Arfi, T.; Viret, J.; Christon, R., 1993: Simultaneous changes in lipid composition, fluidity and enzyme activity in piglet intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta*, **1166**, 229-237.
- Davidson, M. H., 2006: Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*, **98**, 27i-33i.
- Day, J. R.; Albers, J. J.; Lofton-Day, C. E.; Gilbert, T. L.; Ching, A. F.; Grant, F. J.; O'Hara, P. J.; Marcovina, S. M.; Adolphson, J. L., 1994: Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. *J Biol Chem*, **269**, 9388-9391.
- De Caterina, R.; Cybulsky, M. I.; Clinton, S. K.; Gimbrone, M. A., Jr.; Libby, P., 1994: The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb*, **14**, 1829-1836.
- de la Llera-Moya, M.; Rothblat, G. H.; Connelly, M. A.; Kellner-Weibel, G.; Sakr, S. W.; Phillips, M. C.; Williams, D. L., 1999: Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free

- cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res*, **40**, 575-580.
- de Urquiza, A. M.; Liu, S.; Sjoberg, M.; Zetterstrom, R. H.; Griffiths, W.; Sjovall, J.; Perlmann, T., 2000: Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*, **290**, 2140-2144.
- de Vries, R.; Groen, A. K.; Perton, F. G.; Dallinga-Thie, G. M.; van Wijland, M. J.; Dikkeschei, L. D.; Wolffenbuttel, B. H.; van Tol, A.; Dullaart, R. P., 2008: Increased cholesterol efflux from cultured fibroblasts to plasma from hypertriglyceridemic type 2 diabetic patients: roles of pre beta-HDL, phospholipid transfer protein and cholesterol esterification. *Atherosclerosis*, **196**, 733-741.
- Delarue, J.; LeFoll, C.; Corporeau, C.; Lucas, D., 2004: N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev*, **44**, 289-299.
- Dhalla, A. K.; Santikul, M.; Smith, M.; Wong, M. Y.; Shryock, J. C.; Belardinelli, L., 2007: Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, **321**, 327-333.
- Diaz, O.; Berquand, A.; Dubois, M.; Di Agostino, S.; Sette, C.; Bourgoin, S.; Lagarde, M.; Nemoz, G.; Prigent, A. F., 2002: The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J Biol Chem*, **277**, 39368-39378.
- Dimayuga, P.; Zhu, J.; Oguchi, S.; Chyu, K. Y.; Xu, X. O.; Yano, J.; Shah, P. K.; Nilsson, J.; Cercek, B., 1999: Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periadventitial cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 465-468.
- Din, J. N.; Harding, S. A.; Valerio, C. J.; Sarma, J.; Lyall, K.; Riemersma, R. A.; Newby, D. E.; Flapan, A. D., 2008: Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis*, **197**, 290-296.
- Dullaart, R. P.; Perton, F.; van der Klauw, M. M.; Hillege, H. L.; Sluiter, W. J., 2009: High plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity does not predict low incidence of cardiovascular events: Possible attenuation of cardioprotection associated with high HDL cholesterol. *Atherosclerosis*.
- Dullaart, R. P.; van Tol, A., 2001: 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*, **61**, 69-74.
- Duong, P. T.; Weibel, G. L.; Lund-Katz, S.; Rothblat, G. H.; Phillips, M. C., 2008: Characterization and properties of pre beta-HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I. *J Lipid Res*, **49**, 1006-1014.
- Dusserre, E.; Pulcini, T.; Bourdillon, M. C.; Ciavatti, M.; Berthezene, F., 1995: Omega-3 fatty acids in smooth muscle cell phospholipids increase membrane cholesterol efflux. *Lipids*, **30**, 35-41.
- Duverger, N.; Kruth, H.; Emmanuel, F.; Caillaud, J. M.; Viglietta, C.; Castro, G.; Tailleux, A.; Fievet, C.; Fruchart, J. C.; Houdebine, L. M.; Deneffe, P., 1996: Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation*, **94**, 713-717.

- Duvillard, L.; Pont, F.; Florentin, E.; Galland-Jos, C.; Gambert, P.; Verges, B., 2000: Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest*, **30**, 685-694.
- Ecker, J.; Langmann, T.; Moehle, C.; Schmitz, G., 2007: Isomer specific effects of Conjugated Linoleic Acid on macrophage ABCG1 transcription by a SREBP-1c dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **352**, 805-811.
- Edidin, M., 1993: Patches and fences: probing for plasma membrane domains. *J Cell Sci Suppl*, **17**, 165-169.
- Eldho, N. V.; Feller, S. E.; Tristram-Nagle, S.; Polozov, I. V.; Gawrisch, K., 2003: Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid-differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *J Am Chem Soc*, **125**, 6409-6421.
- Endres, S.; Ghorbani, R.; Kelley, V. E.; Georgilis, K.; Lonnemann, G.; van der Meer, J. W.; Cannon, J. G.; Rogers, T. S.; Klempner, M. S.; Weber, P. C.; et al., 1989: The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, **320**, 265-271.
- Esposito, K.; Marfella, R.; Ciotola, M.; Di Palo, C.; Giugliano, F.; Giugliano, G.; D'Armiento, M.; D'Andrea, F.; Giugliano, D., 2004: Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA*, **292**, 1440-1446.
- Fabbrini, E.; Mohammed, B. S.; Korenblat, K. M.; Magkos, F.; McCrea, J.; Patterson, B. W.; Klein, S., 2010: Effect of Fenofibrate and Niacin on Intrahepatic Triglyceride Content, Very Low-Density Lipoproteins Kinetics, and Insulin Action in Obese Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Feller, S. E.; Gawrisch, K., 2005: Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 416-422.
- Fernandez-Galaz, C.; Fernandez-Agullo, T.; Perez, C.; Peralta, S.; Arribas, C.; Andres, A.; Carrascosa, J. M.; Ros, M., 2002: Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia*, **45**, 997-1003.
- Field, C. J.; Ryan, E. A.; Thomson, A. B.; Clandinin, M. T., 1988: Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem J*, **253**, 417-424.
- Fisher, M.; Levine, P. H.; Weiner, B. H.; Johnson, M. H.; Doyle, E. M.; Ellis, P. A.; Hoogasian, J. J., 1990: Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. *Am J Clin Nutr*, **51**, 804-808.
- Fitzgerald, M. L.; Morris, A. L.; Rhee, J. S.; Andersson, L. P.; Mendez, A. J.; Freeman, M. W., 2002: Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, **277**, 33178-33187.
- Flachs, P.; Mohamed-Ali, V.; Horakova, O.; Rossmeisl, M.; Hosseinzadeh-Attar, M. J.; Hensler, M.; Ruzickova, J.; Kopecky, J., 2006: Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, **49**, 394-397.
- Florez, H.; Mendez, A.; Casanova-Romero, P.; Larreal-Urdaneta, C.; Castillo-Florez, S.; Lee, D.; Goldberg, R., 2006: Increased apolipoprotein C-III levels associated with insulin resistance contribute to dyslipidemia in normoglycemic and diabetic subjects from a triethnic population. *Atherosclerosis*, **188**, 134-141.

- Forman, B. M.; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M.; Evans, R. M., 1995: 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 803-812.
- Fournier, N.; Atger, V.; Cogny, A.; Védie, B.; Giral, P.; Simon, A.; Moatti, N.; Paul, J. L., 2001: Analysis of the relationship between triglyceridemia and HDL-phospholipid concentrations: consequences on the efflux capacity of serum in the Fu5AH system. *Atherosclerosis*, **157**, 315-323.
- Francis, G. A.; Knopp, R. H.; Oram, J. F., 1995: Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest*, **96**, 78-87.
- Frank, P. G.; Marcel, Y. L., 2000: Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res*, **41**, 853-872.
- Frenais, R.; Nazih, H.; Ouguerram, K.; Maugeais, C.; Zair, Y.; Bard, J. M.; Charbonnel, B.; Magot, T.; Krempf, M., 2001a: 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*, **86**, 1962-1967.
- Frenais, R.; Ouguerram, K.; Maugeais, C.; Mahot, P.; Charbonnel, B.; Magot, T.; Krempf, M., 2001b: Effect of dietary omega-3 fatty acids on high-density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in type II diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, **157**, 131-135.
- Fruebis, J.; Tsao, T. S.; Javorschi, S.; Ebbets-Reed, D.; Erickson, M. R.; Yen, F. T.; Bihain, B. E.; Lodish, H. F., 2001: Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2005-2010.
- Ganda, O. P., 2009: Refining lipoprotein assessment in diabetes: apolipoprotein B makes sense. *Endocr Pract*, **15**, 370-376.
- Ganji, S. H.; Tavintharan, S.; Zhu, D.; Xing, Y.; Kamanna, V. S.; Kashyap, M. L., 2004: Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J Lipid Res*, **45**, 1835-1845.
- Garcia, A.; Barbaras, R.; Collet, X.; Bogoyo, A.; Chap, H.; Perret, B., 1996: High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry*, **35**, 13064-13071.
- Gardner, C. D.; Fortmann, S. P.; Krauss, R. M., 1996: Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA*, **276**, 875-881.
- Gautier, T.; Masson, D.; de Barros, J. P.; Athias, A.; Gambert, P.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M. H.; Lagrost, L., 2000: Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J Biol Chem*, **275**, 37504-37509.
- Gayet, C.; Bailhache, E.; Dumon, H.; Martin, L.; Siliart, B.; Nguyen, P., 2004a: Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNFalpha, IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **88**, 157-165.
- Gayet, C.; Leray, V.; Nguyen, P.; Siliart, B., 2003: Relationship between leptin, lipoprotein lipase (LPL) and insulin resistance (IR) in obese adult dogs. *J. Vet. Int. Med.*, **17**, 744.
- Gayet, C.; Leray, V.; Saito, M.; Siliart, B.; Nguyen, P., 2007: The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes, in dogs. *Br J Nutr*, **98**, 497-503.

- Gayet, C.; Siliart, B.; Shibata, H.; Honjoh, T.; Saito, M.; Nguyen, P., 2004b: Adiponectin and leptin plasma levels: early markers in the time course of obesity-associated insulin resistance (IR) in dogs. *J. Vet. Int. Med.*, **18**, 421.
- Gelissen, I. C.; Harris, M.; Rye, K. A.; Quinn, C.; Brown, A. J.; Kockx, M.; Cartland, S.; Packianathan, M.; Kritharides, L.; Jessup, W., 2006: ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 534-540.
- Gibney, M. J.; Bolton-Smith, C., 1988: The effect of a dietary supplement of n-3 polyunsaturated fat on platelet lipid composition, platelet function and platelet plasma membrane fluidity in healthy volunteers. *Br J Nutr*, **60**, 5-12.
- Gibney, M. J.; Hunter, B., 1993: The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*, **47**, 255-259.
- Gille, A.; Bodor, E. T.; Ahmed, K.; Offermanns, S., 2008: Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 79-106.
- Gillotte, K. L.; Lund-Katz, S.; de la Llera-Moya, M.; Parks, J. S.; Rudel, L. L.; Rothblat, G. H.; Phillips, M. C., 1998: Dietary modification of high density lipoprotein phospholipid and influence on cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res*, **39**, 2065-2075.
- Ginsberg, B. H.; Jabour, J.; Spector, A. A., 1982: Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells. *Biochim Biophys Acta*, **690**, 157-164.
- Ginsberg, H. N.; Zhang, Y. L.; Hernandez-Ono, A., 2006: Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring)*, **14 Suppl 1**, 41S-49S.
- Giorgione, J.; Epand, R. M.; Buda, C.; Farkas, T., 1995: Role of phospholipids containing docosahexaenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9767-9770.
- Glomset, J. A., 1968: The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, **9**, 155-167.
- Goldberg, A.; Alagona, P., Jr.; Capuzzi, D. M.; Guyton, J.; Morgan, J. M.; Rodgers, J.; Sachson, R.; Samuel, P., 2000: Multiple-dose efficacy and safety of an extended-release form of niacin in the management of hyperlipidemia. *Am J Cardiol*, **85**, 1100-1105.
- Gonzalez-Periz, A.; Horrillo, R.; Ferre, N.; Gronert, K.; Dong, B.; Moran-Salvador, E.; Titos, E.; Martinez-Clemente, M.; Lopez-Parra, M.; Arroyo, V.; Claria, J., 2009: Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by {omega}-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*.
- Gordon, V.; Innerarity, T. L.; Mahley, R. W., 1983: Formation of cholesterol- and apoprotein E-enriched high density lipoproteins in vitro. *J Biol Chem*, **258**, 6202-6212.
- Gotto, A. M., Jr.; Pownall, H. J.; Havel, R. J., 1986: Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*, **128**, 3-41.
- Graf, G. A.; Li, W. P.; Gerard, R. D.; Gelissen, I.; White, A.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H., 2002: Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*, **110**, 659-669.
- Griffin, B. A.; Skinner, E. R.; Maughan, R. J., 1988: Plasma high density lipoprotein subfractions in subjects with different coronary risk indices as assessed by plasma lipoprotein concentrations. *Atherosclerosis*, **70**, 165-169.
- Griffin, M. E.; Marcucci, M. J.; Cline, G. W.; Bell, K.; Barucci, N.; Lee, D.; Goodyear, L. J.; Kraegen, E. W.; White, M. F.; Shulman, G. I., 1999: Free fatty acid-induced insulin

- resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*, **48**, 1270-1274.
- Griffon, N.; Jin, W.; Petty, T. J.; Millar, J.; Badellino, K. O.; Saven, J. G.; Marchadier, D. H.; Kempner, E. S.; Billheimer, J.; Glick, J. M.; Rader, D. J., 2009: Identification of the Active Form of Endothelial Lipase: A Homodimer in a Head-to-tail Conformation. *J Biol Chem*.
- Grundy, S. M.; Vega, G. L.; McGovern, M. E.; Tulloch, B. R.; Kendall, D. M.; Fitz-Patrick, D.; Ganda, O. P.; Rosenson, R. S.; Buse, J. B.; Robertson, D. D.; Sheehan, J. P., 2002: Efficacy, safety, and tolerability of once-daily niacin for the treatment of dyslipidemia associated with type 2 diabetes: results of the assessment of diabetes control and evaluation of the efficacy of niaspan trial. *Arch Intern Med*, **162**, 1568-1576.
- Guerin, M.; Le Goff, W.; Lassel, T. S.; Van Tol, A.; Steiner, G.; Chapman, M. J., 2001: Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 282-288.
- Gustafson, A.; Alaupovic, P.; Furman, R. H., 1966: Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum. *Biochemistry*, **5**, 632-640.
- Hammad, S. M.; Barth, J. L.; Knaak, C.; Argraves, W. S., 2000: Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem*, **275**, 12003-12008.
- Hammad, S. M.; Stefansson, S.; Twal, W. O.; Drake, C. J.; Fleming, P.; Remaley, A.; Brewer, H. B., Jr.; Argraves, W. S., 1999: Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10158-10163.
- Harris, W. S., 1997a: n-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *Am J Clin Nutr*, **65**, 1611S-1616S.
- Harris, W. S., 1997b: n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*, **65**, 1645S-1654S.
- Haugaard, S. B.; Madsbad, S.; Hoy, C. E.; Vaag, A., 2006: Dietary intervention increases n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in skeletal muscle membrane phospholipids of obese subjects. Implications for insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **64**, 169-178.
- Havel, R. J., 1986: Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. *Annu Rev Physiol*, **48**, 119-134.
- Healy, D. A.; Wallace, F. A.; Miles, E. A.; Calder, P. C.; Newsholm, P., 2000: Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids*, **35**, 763-768.
- Hedrick, C. C.; Lusic, A. J., 1994: Apolipoprotein A-II: a protein in search of a function. *Can J Cardiol*, **10**, 453-459.
- Hendriks, T.; De Pont, J. J.; Daemen, F. J.; Bonting, S. L., 1973: Biochemical aspects of the visual process. XXIV. Adenylate cyclase and rod photoreceptor membranes: a critical appraisal. *Biochim Biophys Acta*, **330**, 156-166.
- Hernandez, M.; Wright, S. D.; Cai, T. Q., 2007: Critical role of cholesterol ester transfer protein in nicotinic acid-mediated HDL elevation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**, 1075-1080.

- Hertz, R.; Magenheim, J.; Berman, I.; Bar-Tana, J., 1998: Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature*, **392**, 512-516.
- Hinrichs, J. W.; Klappe, K.; van Riesen, M.; Kok, J. W., 2005: Drug resistance-associated changes in sphingolipids and ABC transporters occur in different regions of membrane domains. *J Lipid Res*, **46**, 2367-2376.
- Hirano, K.; Yamashita, S.; Nakajima, N.; Arai, T.; Maruyama, T.; Yoshida, Y.; Ishigami, M.; Sakai, N.; Kameda-Takemura, K.; Matsuzawa, Y., 1997: Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1053-1059.
- Hodis, H. N., 1999: Triglyceride-rich lipoprotein remnant particles and risk of atherosclerosis. *Circulation*, **99**, 2852-2854.
- Holleboom, A. G.; Kuivenhoven, J. A.; Vergeer, M.; Hovingh, G. K.; van Miert, J. N.; Wareham, N. J.; Kastelein, J. J.; Khaw, K. T.; Boekholdt, S. M., 2009: Plasma levels of lecithin:cholesterol acyltransferase and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women - a prospective case-control analysis nested in the EPIC-Norfolk population study. *J Lipid Res*.
- Hong, S.; Gronert, K.; Devchand, P. R.; Moussignac, R. L.; Serhan, C. N., 2003: Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosaehaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*, **278**, 14677-14687.
- Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S., 2002: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**, 1125-1131.
- Hotamisligil, G. S., 1999: Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **107**, 119-125.
- Hotta, K.; Funahashi, T.; Arita, Y.; Takahashi, M.; Matsuda, M.; Okamoto, Y.; Iwahashi, H.; Kuriyama, H.; Ouchi, N.; Maeda, K.; Nishida, M.; Kihara, S.; Sakai, N.; Nakajima, T.; Hasegawa, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Hanafusa, T.; Matsuzawa, Y., 2000: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1595-1599.
- Hu, Y. W.; Ma, X.; Li, X. X.; Liu, X. H.; Xiao, J.; Mo, Z. C.; Xiang, J.; Liao, D. F.; Tang, C. K., 2009: Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis*, **204**, e35-43.
- Hussein, O.; Grosovski, M.; Lasri, E.; Svalb, S.; Ravid, U.; Assy, N., 2007: Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*, **13**, 361-368.
- Huuskonen, J.; Olkkonen, V. M.; Jauhiainen, M.; Ehnholm, C., 2001: The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, **155**, 269-281.
- Ikewaki, K.; Nishiwaki, M.; Sakamoto, T.; Ishikawa, T.; Fairwell, T.; Zech, L. A.; Nagano, M.; Nakamura, H.; Brewer, H. B., Jr.; Rader, D. J., 1995: Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest*, **96**, 1573-1581.
- Ikewaki, K.; Rader, D. J.; Schaefer, J. R.; Fairwell, T.; Zech, L. A.; Brewer, H. B., Jr., 1993: Evaluation of apoA-I kinetics in humans using simultaneous endogenous stable isotope and exogenous radiotracer methods. *J Lipid Res*, **34**, 2207-2215.

- Iqbal, J.; Hussain, M. M., 2009: Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**, E1183-1194.
- Irvine, A. J.; Butterwick, R.; Watson, T.; Millward, D. J.; Morgan, L. M., 2002: Dietary supplementation with (n-3) polyunsaturated fatty acids does not affect insulin sensitivity in healthy Labrador retriever dogs. *J Nutr*, **132**, 1709S-1710S.
- Ishida, T.; Choi, S.; Kundu, R. K.; Hirata, K.; Rubin, E. M.; Cooper, A. D.; Quertermous, T., 2003: Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest*, **111**, 347-355.
- Isomaa, B.; Almgren, P.; Tuomi, T.; Forsen, B.; Lahti, K.; Nissen, M.; Taskinen, M. R.; Groop, L., 2001: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, **24**, 683-689.
- Ji, Y.; Jian, B.; Wang, N.; Sun, Y.; Moya, M. L.; Phillips, M. C.; Rothblat, G. H.; Swaney, J. B.; Tall, A. R., 1997: Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*, **272**, 20982-20985.
- Jiang, X. C.; Bruce, C.; Mar, J.; Lin, M.; Ji, Y.; Francone, O. L.; Tall, A. R., 1999: Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest*, **103**, 907-914.
- Jiang, X. C.; Masucci-Magoulas, L.; Mar, J.; Lin, M.; Walsh, A.; Breslow, J. L.; Tall, A., 1993: Down-regulation of mRNA for the low density lipoprotein receptor in transgenic mice containing the gene for human cholesteryl ester transfer protein. Mechanism to explain accumulation of lipoprotein B particles. *J Biol Chem*, **268**, 27406-27412.
- Jiang, X. C.; Qin, S.; Qiao, C.; Kawano, K.; Lin, M.; Skold, A.; Xiao, X.; Tall, A. R., 2001: Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat Med*, **7**, 847-852.
- Jin, F. Y.; Kamanna, V. S.; Kashyap, M. L., 1997: Niacin decreases removal of high-density lipoprotein apolipoprotein A-I but not cholesterol ester by Hep G2 cells. Implication for reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2020-2028.
- Jin, F. Y.; Kamanna, V. S.; Kashyap, M. L., 1999: Niacin accelerates intracellular ApoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1051-1059.
- Johansson, J.; Carlson, L. A.; Landou, C.; Hamsten, A., 1991: High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb*, **11**, 174-182.
- Jonkers, I. J.; Smelt, A. H.; Hattori, H.; Scheek, L. M.; van Gent, T.; de Man, F. H.; van der Laarse, A.; van Tol, A., 2003: Decreased PLTP mass but elevated PLTP activity linked to insulin resistance in HTG: effects of bezafibrate therapy. *J Lipid Res*, **44**, 1462-1469.
- Joy, T.; Hegele, R. A., 2009: The end of the road for CETP inhibitors after torcetrapib? *Curr Opin Cardiol*, **24**, 364-371.
- Jump, D. B., 2002: Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol*, **13**, 155-164.
- Jung, J. K.; Johnson, B. R.; Duong, T.; Decaire, M.; Uy, J.; Gharbaoui, T.; Boatman, P. D.; Sage, C. R.; Chen, R.; Richman, J. G.; Connolly, D. T.; Semple, G., 2007: Analogues of acifran: agonists of the high and low affinity niacin receptors, GPR109a and GPR109b. *J Med Chem*, **50**, 1445-1448.
- Kabir, M.; Catalano, K. J.; Ananthnarayan, S.; Kim, S. P.; Van Citters, G. W.; Dea, M. K.; Bergman, R. N., 2005: Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **288**, E454-461.

- Kaiyala, K. J.; Prigeon, R. L.; Kahn, S. E.; Woods, S. C.; Schwartz, M. W., 2000: Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes*, **49**, 1525-1533.
- Kamada, T.; Yamashita, T.; Baba, Y.; Kai, M.; Setoyama, S.; Chuman, Y.; Otsuji, S., 1986: Dietary sardine oil increases erythrocyte membrane fluidity in diabetic patients. *Diabetes*, **35**, 604-611.
- Kamanna, V. S.; Kashyap, M. L., 2008: Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol*, **101**, 20B-26B.
- Karlsson, M.; Marild, S.; Brandberg, J.; Lonn, L.; Friberg, P.; Strandvik, B., 2006: Serum phospholipid fatty acids, adipose tissue, and metabolic markers in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)*, **14**, 1931-1939.
- Karpe, F.; Ehrenborg, E. E., 2009: PPARdelta in humans: genetic and pharmacological evidence for a significant metabolic function. *Curr Opin Lipidol*, **20**, 333-336.
- Kaser, S.; Sandhofer, A.; Foger, B.; Ebenbichler, C. F.; Igelseder, B.; Malaimare, L.; Paulweber, B.; Patsch, J. R., 2001: Influence of obesity and insulin sensitivity on phospholipid transfer protein activity. *Diabetologia*, **44**, 1111-1117.
- Kasim-Karakas, S. E.; Herrmann, R.; Almario, R., 1995: Effects of omega-3 fatty acids on intravascular lipolysis of very-low-density lipoproteins in humans. *Metabolism*, **44**, 1223-1230.
- Kast, H. R.; Nguyen, C. M.; Sinal, C. J.; Jones, S. A.; Laffitte, B. A.; Reue, K.; Gonzalez, F. J.; Willson, T. M.; Edwards, P. A., 2001: Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol*, **15**, 1720-1728.
- Kelley, D. S.; Taylor, P. C.; Nelson, G. J.; Mackey, B. E., 1998: Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. *Lipids*, **33**, 125-130.
- Kelley, D. S.; Taylor, P. C.; Nelson, G. J.; Schmidt, P. C.; Ferretti, A.; Erickson, K. L.; Yu, R.; Chandra, R. K.; Mackey, B. E., 1999: Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids*, **34**, 317-324.
- Kelly, J. J.; Lawson, J. A.; Campbell, L. V.; Storlien, L. H.; Jenkins, A. B.; Whitworth, J. A.; O'Sullivan, A. J., 2000: Effects of nicotinic acid on insulin sensitivity and blood pressure in healthy subjects. *J Hum Hypertens*, **14**, 567-572.
- Kennedy, A.; Martinez, K.; Chuang, C. C.; LaPoint, K.; McIntosh, M., 2009: Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr*, **139**, 1-4.
- Kennedy, M. A.; Barrera, G. C.; Nakamura, K.; Baldan, A.; Tarr, P.; Fishbein, M. C.; Frank, J.; Francone, O. L.; Edwards, P. A., 2005: ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*, **1**, 121-131.
- Kennedy, M. A.; Venkateswaran, A.; Tarr, P. T.; Xenarios, I.; Kudoh, J.; Shimizu, N.; Edwards, P. A., 2001: Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem*, **276**, 39438-39447.
- Kershaw, E. E.; Flier, J. S., 2004: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 2548-2556.

- Kew, S.; Banerjee, T.; Minihane, A. M.; Finnegan, Y. E.; Muggli, R.; Albers, R.; Williams, C. M.; Calder, P. C., 2003: Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr*, **77**, 1287-1295.
- Khalfoun, B.; Thibault, F.; Watier, H.; Bardos, P.; Lebranchu, Y., 1997: Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol*, **400B**, 589-597.
- Khan, S.; Minihane, A. M.; Talmud, P. J.; Wright, J. W.; Murphy, M. C.; Williams, C. M.; Griffin, B. A., 2002: Dietary long-chain n-3 PUFAs increase LPL gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *J Lipid Res*, **43**, 979-985.
- Kido, Y.; Nakae, J.; Accili, D., 2001: Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 972-979.
- Kielar, D.; Dietmaier, W.; Langmann, T.; Aslanidis, C.; Probst, M.; Naruszewicz, M.; Schmitz, G., 2001: Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, **47**, 2089-2097.
- Kim, S. P.; Ellmerer, M.; Van Citters, G. W.; Bergman, R. N., 2003: Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes*, **52**, 2453-2460.
- Klucken, J.; Buchler, C.; Orso, E.; Kaminski, W. E.; Porsch-Ozcurumez, M.; Liebisch, G.; Kapinsky, M.; Diederich, W.; Drobnik, W.; Dean, M.; Allikmets, R.; Schmitz, G., 2000: ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 817-822.
- Knudsen, P.; Eriksson, J.; Lahdenpera, S.; Kahri, J.; Groop, L.; Taskinen, M. R., 1995: Changes of lipolytic enzymes cluster with insulin resistance syndrome. Botnia Study Group. *Diabetologia*, **38**, 344-350.
- Kovanen, P. T.; Bilheimer, D. W.; Goldstein, J. L.; Jaramillo, J. J.; Brown, M. S., 1981: Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1194-1198.
- Kozarsky, K. F.; Donahee, M. H.; Glick, J. M.; Krieger, M.; Rader, D. J., 2000: Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 721-727.
- Kozarsky, K. F.; Donahee, M. H.; Rigotti, A.; Iqbal, S. N.; Edelman, E. R.; Krieger, M., 1997: Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, **387**, 414-417.
- Kozyraki, R., 2001: Cubilin, a multifunctional epithelial receptor: an overview. *J Mol Med*, **79**, 161-167.
- Krey, G.; Braissant, O.; L'Horset, F.; Kalkhoven, E.; Perroud, M.; Parker, M. G.; Wahli, W., 1997: Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, **11**, 779-791.
- Kromhout, D.; Bosschieter, E. B.; de Lezenne Coulander, C., 1985: The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*, **312**, 1205-1209.
- Krook, A.; Wallberg-Henriksson, H.; Zierath, J. R., 2004: Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Med Sci Sports Exerc*, **36**, 1212-1217.

- Kruit, J. K.; Groen, A. K.; van Berkel, T. J.; Kuipers, F., 2006: Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol*, **12**, 6429-6439.
- Lafay, L.; Verger, E., 2010: Les apports en lipides d'origine animale de la population française : résultats de l'étude INCA2. *OCL*, **17**, 17-21.
- Laflamme, D. P.; Kuhlman, G.; Lawler, D. F., 1997: Evaluation of weight loss protocols for dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, **33**, 253-259.
- Lafontan, M.; Girard, J., 2008: Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab*, **34**, 317-327.
- Lagrost, L., 1997: The role of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein in the remodeling of plasma high-density lipoproteins. *Trends Cardiovasc Med*, **7**, 218-224.
- Lagrost, L.; Dengremont, C.; Athias, A.; de Geitere, C.; Fruchart, J. C.; Lallemand, C.; Gambert, P.; Castro, G., 1995: Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by the apolipoprotein content of high density lipoprotein particles. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II. *J Biol Chem*, **270**, 13004-13009.
- Lakka, H. M.; Laaksonen, D. E.; Lakka, T. A.; Niskanen, L. K.; Kumpusalo, E.; Tuomilehto, J.; Salonen, J. T., 2002: The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*, **288**, 2709-2716.
- Lamarche, B.; Tchernof, A.; Mauriege, P.; Cantin, B.; Dagenais, G. R.; Lupien, P. J.; Despres, J. P., 1998: Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *JAMA*, **279**, 1955-1961.
- Lambert, G.; Amar, M. J.; Guo, G.; Brewer, H. B., Jr.; Gonzalez, F. J.; Sinal, C. J., 2003: The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*, **278**, 2563-2570.
- Lambert, G.; Amar, M. J.; Martin, P.; Fruchart-Najib, J.; Foger, B.; Shamburek, R. D.; Brewer, H. B., Jr.; Santamarina-Fojo, S., 2000: Hepatic lipase deficiency decreases the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in vivo. *J Lipid Res*, **41**, 667-672.
- Lambert, G.; Chase, M. B.; Dugi, K.; Bensadoun, A.; Brewer, H. B., Jr.; Santamarina-Fojo, S., 1999: Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J Lipid Res*, **40**, 1294-1303.
- Lammert, F.; Wang, D. Q., 2005: New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology*, **129**, 718-734.
- Lamon-Fava, S.; Diffenderfer, M. R.; Barrett, P. H.; Buchsbaum, A.; Nyaku, M.; Horvath, K. V.; Asztalos, B. F.; Otokoza, S.; Ai, M.; Matthan, N. R.; Lichtenstein, A. H.; Dolnikowski, G. G.; Schaefer, E. J., 2008: Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 1672-1678.
- Langmann, T.; Klucken, J.; Reil, M.; Liebisch, G.; Luciani, M. F.; Chimini, G.; Kaminski, W. E.; Schmitz, G., 1999: Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 29-33.
- Le Morvan, V.; Dumon, M. F.; Palos-Pinto, A.; Berard, A. M., 2002: n-3 FA increase liver uptake of HDL-cholesterol in mice. *Lipids*, **37**, 767-772.
- Lee, J. H.; O'Keefe, J. H.; Lavie, C. J.; Marchioli, R.; Harris, W. S., 2008: Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin Proc*, **83**, 324-332.

- Lee, S. J.; Moye, L. A.; Campos, H.; Williams, G. H.; Sacks, F. M., 2003: Hypertriglyceridemia but not diabetes status is associated with VLDL containing apolipoprotein CIII in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, **167**, 293-302.
- Legrand, P., 2010: les nouveaux ANC en acides gras : une actualisation nécessaire. *Cholé-Doc*, **118**.
- Lemberger, T.; Braissant, O.; Juge-Aubry, C.; Keller, H.; Saladin, R.; Staels, B.; Auwerx, J.; Burger, A. G.; Meier, C. A.; Wahli, W., 1996: PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*, **804**, 231-251.
- Leray, V.; Gayet, C.; Martin, L.; Dumon, H.; Siliart, B.; Nguyen, P., 2004: Modulation of uncoupling protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipose tissue in obese insulin-resistant dogs. *J Nutr*, **134**, 2154S-2157S.
- Li, A. C.; Binder, C. J.; Gutierrez, A.; Brown, K. K.; Plotkin, C. R.; Pattison, J. W.; Valledor, A. F.; Davis, R. A.; Willson, T. M.; Witztum, J. L.; Palinski, W.; Glass, C. K., 2004: Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*, **114**, 1564-1576.
- Liang, X.; Nazarian, A.; Erdjument-Bromage, H.; Bornmann, W.; Tempst, P.; Resh, M. D., 2001: Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem*, **276**, 30987-30994.
- Lo, C. J.; Chiu, K. C.; Fu, M.; Lo, R.; Helton, S., 1999: Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res*, **82**, 216-221.
- Lombardo, Y. B.; Chicco, A.; D'Alessandro, M. E.; Martinelli, M.; Soria, A.; Gutman, R., 1996: Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochim Biophys Acta*, **1299**, 175-182.
- Lombardo, Y. B.; Chicco, A. G., 2006: Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem*, **17**, 1-13.
- Lombardo, Y. B.; Hein, G.; Chicco, A., 2007: Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids*, **42**, 427-437.
- Lundasen, T.; Liao, W.; Angelin, B.; Rudling, M., 2003: 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*, **278**, 43224-43228.
- Luostarinen, R.; Saldeen, T., 1996: Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **55**, 167-172.
- Madsen, L.; Petersen, R. K.; Kristiansen, K., 2005: Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, **1740**, 266-286.
- Mahley, R. W.; Huang, Y.; Weisgraber, K. H., 2006: Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest*, **116**, 1226-1229.
- Mahley, R. W.; Hui, D. Y.; Innerarity, T. L.; Weisgraber, K. H., 1981: Two independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine, and man. Apo-B,E and apo-E receptors. *J Clin Invest*, **68**, 1197-1206.
- Mahley, R. W.; Weisgraber, K. H., 1974: Canine lipoproteins and atherosclerosis. I. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ Res*, **35**, 713-721.
- Mahley, R. W.; Weisgraber, K. H.; Innerarity, T., 1974: Canine lipoproteins and atherosclerosis. II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipidemia. *Circ Res*, **35**, 722-733.

- Mahley, R. W.; Weisgraber, K. H.; Innerarity, T.; Brewer, H. B., Jr., 1976: Characterization of the plasma lipoproteins and apoproteins of the *Erythrocebus patas* monkey. *Biochemistry*, **15**, 1928-1933.
- Maldonado, E. N.; Romero, J. R.; Ochoa, B.; Avelano, M. I., 2001: Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **128**, 719-729.
- Malik, S., 2003: Transcriptional regulation of the apolipoprotein AI gene. *Front Biosci*, **8**, d360-368.
- Marcheselli, V. L.; Hong, S.; Lukiw, W. J.; Tian, X. H.; Gronert, K.; Musto, A.; Hardy, M.; Gimenez, J. M.; Chiang, N.; Serhan, C. N.; Bazan, N. G., 2003: Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem*, **278**, 43807-43817.
- Marchioli, R.; Barzi, F.; Bomba, E.; Chieffo, C.; Di Gregorio, D.; Di Mascio, R.; Franzosi, M. G.; Geraci, E.; Levantesi, G.; Maggioni, A. P.; Mantini, L.; Marfisi, R. M.; Mastrogiuseppe, G.; Mininni, N.; Nicolosi, G. L.; Santini, M.; Schweiger, C.; Tavazzi, L.; Tognoni, G.; Tucci, C.; Valagussa, F., 2002: Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*, **105**, 1897-1903.
- Martinez, L. O.; Jacquet, S.; Esteve, J. P.; Rolland, C.; Cabezon, E.; Champagne, E.; Pineau, T.; Georgeaud, V.; Walker, J. E.; Terce, F.; Collet, X.; Perret, B.; Barbaras, R., 2003: Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, **421**, 75-79.
- Martins, I. J.; Redgrave, T. G., 2004: Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine? *J Nutr Biochem*, **15**, 130-141.
- Mater, M. K.; Pan, D.; Bergen, W. G.; Jump, D. B., 1998: Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *J Lipid Res*, **39**, 1327-1334.
- Matthan, N. R.; Jordan, H.; Chung, M.; Lichtenstein, A. H.; Lathrop, D. A.; Lau, J., 2005: A systematic review and meta-analysis of the impact of omega-3 fatty acids on selected arrhythmia outcomes in animal models. *Metabolism*, **54**, 1557-1565.
- Maugeais, C.; Tietge, U. J.; Broedl, U. C.; Marchadier, D.; Cain, W.; McCoy, M. G.; Lund-Katz, S.; Glick, J. M.; Rader, D. J., 2003: Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation*, **108**, 2121-2126.
- McCallum, C. D.; Epand, R. M., 1995: Insulin receptor autophosphorylation and signaling is altered by modulation of membrane physical properties. *Biochemistry*, **34**, 1815-1824.
- McCoy, M. G.; Sun, G. S.; Marchadier, D.; Maugeais, C.; Glick, J. M.; Rader, D. J., 2002: Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res*, **43**, 921-929.
- McNeish, J.; Aiello, R. J.; Guyot, D.; Turi, T.; Gabel, C.; Aldinger, C.; Hoppe, K. L.; Roach, M. L.; Royer, L. J.; de Wet, J.; Broccardo, C.; Chimini, G.; Francone, O. L., 2000: 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*, **97**, 4245-4250.
- Meier, U.; Gressner, A. M., 2004: Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*, **50**, 1511-1525.

- Merkel, M.; Eckel, R. H.; Goldberg, I. J., 2002: Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*, **43**, 1997-2006.
- Meyers, C. D.; Kashyap, M. L., 2004: Management of the metabolic syndrome-nicotinic acid. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **33**, 557-575, vii.
- Miles, E. A.; Banerjee, T.; Dooper, M. M.; M'Rabet, L.; Graus, Y. M.; Calder, P. C., 2004: The influence of different combinations of gamma-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr*, **91**, 893-903.
- Mitchell, D. C.; Litman, B. J., 1998: Effect of cholesterol on molecular order and dynamics in highly polyunsaturated phospholipid bilayers. *Biophys J*, **75**, 896-908.
- Mitchell, D. C.; Straume, M.; Litman, B. J., 1992: Role of sn-1-saturated,sn-2-polyunsaturated phospholipids in control of membrane receptor conformational equilibrium: effects of cholesterol and acyl chain unsaturation on the metarhodopsin I in equilibrium with metarhodopsin II equilibrium. *Biochemistry*, **31**, 662-670.
- Mittelman, S. D.; Van Citters, G. W.; Kirkman, E. L.; Bergman, R. N., 2002: Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes*, **51**, 755-761.
- Moerland, M.; Anghelescu, N.; Samyn, H.; van Haperen, R.; van Gent, T.; Strouboulis, J.; van Tol, A.; Grosveld, F.; de Crom, R., 2007: Inducible expression of phospholipid transfer protein (PLTP) in transgenic mice: acute effects of PLTP on lipoprotein metabolism. *Transgenic Res*, **16**, 503-513.
- Moffett, S.; Brown, D. A.; Linder, M. E., 2000: Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem*, **275**, 2191-2198.
- Morgado, N.; Rigotti, A.; Valenzuela, A., 2005: Comparative effect of fish oil feeding and other dietary fatty acids on plasma lipoproteins, biliary lipids, and hepatic expression of proteins involved in reverse cholesterol transport in the rat. *Ann Nutr Metab*, **49**, 397-406.
- Morgan, J. M.; Capuzzi, D. M.; Baksh, R. I.; Intenzo, C.; Carey, C. M.; Reese, D.; Walker, K., 2003: Effects of extended-release niacin on lipoprotein subclass distribution. *Am J Cardiol*, **91**, 1432-1436.
- Mori, T. A.; Burke, V.; Puddey, I. B.; Watts, G. F.; O'Neal, D. N.; Best, J. D.; Beilin, L. J., 2000: Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr*, **71**, 1085-1094.
- Muhlhausler, B. S.; Cook-Johnson, R.; James, M.; Miljkovic, D.; Duthoit, E.; Gibson, R., 2010: Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated Fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. *J Nutr Metab*, **2010**.
- Mukherjee, P. K.; Marcheselli, V. L.; Serhan, C. N.; Bazan, N. G., 2004: Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8491-8496.
- Mulya, A.; Lee, J. Y.; Gebre, A. K.; Thomas, M. J.; Colvin, P. L.; Parks, J. S., 2007: Minimal lipidation of pre-beta HDL by ABCA1 results in reduced ability to interact with ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 1828-1836.
- Murakami, T.; Michelagnoli, S.; Longhi, R.; Gianfranceschi, G.; Pazzucconi, F.; Calabresi, L.; Sirtori, C. R.; Franceschini, G., 1995: Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 1819-1828.
- Nakamura, K.; Kennedy, M. A.; Baldan, A.; Bojanic, D. D.; Lyons, K.; Edwards, P. A., 2004: Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1

- mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem*, **279**, 45980-45989.
- Natarajan, P.; Ray, K. K.; Cannon, C. P., 2010: High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol*, **55**, 1283-1299.
- NCEP, 2001: Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, **285**, 2486-2497.
- Neschen, S.; Morino, K.; Dong, J.; Wang-Fischer, Y.; Cline, G. W.; Romanelli, A. J.; Rossbacher, J. C.; Moore, I. K.; Regittnig, W.; Munoz, D. S.; Kim, J. H.; Shulman, G. I., 2007: n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes*, **56**, 1034-1041.
- Nieland, T. J.; Shaw, J. T.; Jaipuri, F. A.; Maliga, Z.; Duffner, J. L.; Koehler, A. N.; Krieger, M., 2007: Influence of HDL-cholesterol-elevating drugs on the in vitro activity of the HDL receptor SR-BI. *J Lipid Res*, **48**, 1832-1845.
- Nishimoto, T.; Pellizzon, M. A.; Aihara, M.; Stylianou, I. M.; Billheimer, J. T.; Rothblat, G.; Rader, D. J., 2009: Fish Oil Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- NRC, N. R. C., 1985: *Nutrients Requirements of dogs*. National Academy Press, Washington, DC.
- Ogata, M.; Tsujita, M.; Hossain, M. A.; Akita, N.; Gonzalez, F. J.; Staels, B.; Suzuki, S.; Fukutomi, T.; Kimura, G.; Yokoyama, S., 2009: On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. *Atherosclerosis*, **205**, 413-419.
- Okamoto, H.; Yonemori, F.; Wakitani, K.; Minowa, T.; Maeda, K.; Shinkai, H., 2000: A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature*, **406**, 203-207.
- Ooi, E. M.; Barrett, P. H.; Chan, D. C.; Watts, G. F., 2008: Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)*, **114**, 611-624.
- Oram, J. F.; Heinecke, J. W., 2005: ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*, **85**, 1343-1372.
- Oram, J. F.; Vaughan, A. M., 2000: ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol*, **11**, 253-260.
- Ostman, J.; Arner, P.; Engfeldt, P.; Kager, L., 1979: Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism*, **28**, 1198-1205.
- Ou, J.; Tu, H.; Shan, B.; Luk, A.; DeBose-Boyd, R. A.; Bashmakov, Y.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S., 2001: Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6027-6032.
- Ouguerram, K.; Krempf, M.; Maugeais, C.; Maugeere, P.; Darmaun, D.; Magot, T., 2002: A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism*, **51**, 5-11.
- Ouguerram, K.; Maugeais, C.; Gardette, J.; Magot, T.; Krempf, M., 2006: Effect of n-3 fatty acids on metabolism of apoB100-containing lipoprotein in type 2 diabetic subjects. *Br J Nutr*, **96**, 100-106.
- Ouguerram, K.; Nguyen, P.; Krempf, M.; Pouteau, E.; Briand, F.; Bailhache, E.; Magot, T., 2004: 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*, **138**, 339-345.

- Pal, S.; Davis, P. J., 1990: N-3 polyunsaturated fatty acids enhance cholesterol efflux from human fibroblasts in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, **173**, 566-570.
- Pan, M.; Cederbaum, A. I.; Zhang, Y. L.; Ginsberg, H. N.; Williams, K. J.; Fisher, E. A., 2004: Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest*, **113**, 1277-1287.
- Park, Y.; Harris, W. S., 2003: Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res*, **44**, 455-463.
- Pasarica, M.; Rood, J.; Ravussin, E.; Schwarz, J. M.; Smith, S. R.; Redman, L. M., 2010: Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab*, **95**, 4052-4055.
- Pawar, A.; Jump, D. B., 2003: Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*, **278**, 35931-35939.
- Pawlosky, R. J.; Hibbeln, J. R.; Novotny, J. A.; Salem, N., Jr., 2001: Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res*, **42**, 1257-1265.
- Pegorier, J. P.; Le May, C.; Girard, J., 2004: Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr*, **134**, 2444S-2449S.
- Perez-Matute, P.; Perez-Echarri, N.; Martinez, J. A.; Marti, A.; Moreno-Aliaga, M. J., 2007: Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr*, **97**, 389-398.
- Perona, J. S.; Ruiz-Gutierrez, V., 2004: Virgin olive oil normalizes the altered triacylglycerol molecular species composition of adipose tissue in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*, **52**, 4227-4233.
- Perret, B.; Mabile, L.; Martinez, L.; Terce, F.; Barbaras, R.; Collet, X., 2002: Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res*, **43**, 1163-1169.
- Petrescu, A. D.; Hertz, R.; Bar-Tana, J.; Schroeder, F.; Kier, A. B., 2002: Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J Biol Chem*, **277**, 23988-23999.
- Pezeshkian, M.; Noori, M.; Najjarpour-Jabbari, H.; Abolfathi, A.; Darabi, M.; Shaaker, M.; Shahmohammadi, G., 2009: Fatty Acid Composition of Epicardial and Subcutaneous Human Adipose Tissue. *Metab Syndr Relat Disord*.
- Pineda Torra, I.; Claudel, T.; Duval, C.; Kosykh, V.; Fruchart, J. C.; Staels, B., 2003: Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol*, **17**, 259-272.
- Plosch, T.; Kok, T.; Bloks, V. W.; Smit, M. J.; Havinga, R.; Chimini, G.; Groen, A. K.; Kuipers, F., 2002: Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J Biol Chem*, **277**, 33870-33877.
- Pont, F.; Duvillard, L.; Florentin, E.; Gambert, P.; Verges, B., 2002: Early kinetic abnormalities of apoB-containing lipoproteins in insulin-resistant women with abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 1726-1732.
- Popp-Snijders, C.; Schouten, J. A.; van Blitterswijk, W. J.; van der Veen, E. A., 1986: Changes in membrane lipid composition of human erythrocytes after dietary supplementation of (n-3) polyunsaturated fatty acids. Maintenance of membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta*, **854**, 31-37.

- Powell, L. M.; Wallis, S. C.; Pease, R. J.; Edwards, Y. H.; Knott, T. J.; Scott, J., 1987: A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*, **50**, 831-840.
- Poynten, A. M.; Gan, S. K.; Kriketos, A. D.; O'Sullivan, A.; Kelly, J. J.; Ellis, B. A.; Chisholm, D. J.; Campbell, L. V., 2003: Nicotinic acid-induced insulin resistance is related to increased circulating fatty acids and fat oxidation but not muscle lipid content. *Metabolism*, **52**, 699-704.
- Qin, S.; Kawano, K.; Bruce, C.; Lin, M.; Bisgaier, C.; Tall, A. R.; Jiang, X., 2000: Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV-rich lamellar lipoproteins. *J Lipid Res*, **41**, 269-276.
- Qiu, W.; Taghibiglou, C.; Avramoglu, R. K.; Van Iderstine, S. C.; Naples, M.; Ashrafpour, H.; Mhapsekar, S.; Sato, R.; Adeli, K., 2005: Oleate-mediated stimulation of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene promoter: implications for hepatic MTP overexpression in insulin resistance. *Biochemistry*, **44**, 3041-3049.
- Quarfordt, S. H.; Michalopoulos, G.; Schirmer, B., 1982: The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. *J Biol Chem*, **257**, 14642-14647.
- Raclot, T., 2003: Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, **42**, 257-288.
- Raclot, T.; Langin, D.; Lafontan, M.; Groscolas, R., 1997: Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochem J*, **324 (Pt 3)**, 911-915.
- Raclot, T.; Mioskowski, E.; Bach, A. C.; Groscolas, R., 1995: Selectivity of fatty acid mobilization: a general metabolic feature of adipose tissue. *Am J Physiol*, **269**, R1060-1067.
- Radcliffe, J. D.; Czajka-Narins, D. M.; Imrhan, V., 2004: Fatty acid composition of serum, adipose tissue, and liver in rats fed diets containing corn oil or cottonseed oil. *Plant Foods Hum Nutr*, **59**, 73-77.
- Radojkovic, C.; Genoux, A.; Pons, V.; Combes, G.; de Jonge, H.; Champagne, E.; Rolland, C.; Perret, B.; Collet, X.; Terce, F.; Martinez, L. O., 2009: Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 1125-1130.
- Radziuk, J., 2000: Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4426-4433.
- Rajala, M. W.; Obici, S.; Scherer, P. E.; Rossetti, L., 2003: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*, **111**, 225-230.
- Rajamoorthi, K.; Petrache, H. I.; McIntosh, T. J.; Brown, M. F., 2005: Packing and viscoelasticity of polyunsaturated omega-3 and omega-6 lipid bilayers as seen by (2)H NMR and X-ray diffraction. *J Am Chem Soc*, **127**, 1576-1588.
- Rajaram, O. V.; Barter, P. J., 1985: Reactivity of human lipoproteins with purified lecithin: cholesterol acyltransferase during incubations in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **835**, 41-49.
- Randle, P. J.; Garland, P. B.; Hales, C. N.; Newsholme, E. A., 1963: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, **1**, 785-789.
- Rangwala, S. M.; Lazar, M. A., 2004: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 331-336.

- Remaley, A. T.; Stonik, J. A.; Demosky, S. J.; Neufeld, E. B.; Bocharov, A. V.; Vishnyakova, T. G.; Eggerman, T. L.; Patterson, A. P.; Duverger, N. J.; Santamarina-Fojo, S.; Brewer, H. B., Jr., 2001: Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 818-823.
- Renier, G.; Skamene, E.; DeSanctis, J.; Radzioch, D., 1993: Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb*, **13**, 1515-1524.
- Repa, J. J.; Mangelsdorf, D. J., 2000: The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 459-481.
- Reynoso, R.; Salgado, L. M.; Calderon, V., 2003: High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Biochem*, **246**, 155-162.
- Riemens, S.; van Tol, A.; Sluiter, W.; Dullaart, R., 1998a: Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*, **140**, 71-79.
- Riemens, S. C.; van Tol, A.; Sluiter, W. J.; Dullaart, R. P., 1998b: Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia*, **41**, 929-934.
- Riemens, S. C.; Van Tol, A.; Sluiter, W. J.; Dullaart, R. P., 1999a: Acute and chronic effects of a 24-hour intravenous triglyceride emulsion challenge on plasma lecithin: cholesterol acyltransferase, phospholipid transfer protein, and cholesteryl ester transfer protein activities. *J Lipid Res*, **40**, 1459-1466.
- Riemens, S. C.; Van Tol, A.; Stulp, B. K.; Dullaart, R. P., 1999b: Influence of insulin sensitivity and the TaqIB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism on plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activities and their response to hyperinsulinemia in non-diabetic men. *J Lipid Res*, **40**, 1467-1474.
- Rigotti, A.; Miettinen, H. E.; Krieger, M., 2003: The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, **24**, 357-387.
- Rigotti, A.; Trigatti, B. L.; Penman, M.; Rayburn, H.; Herz, J.; Krieger, M., 1997: A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12610-12615.
- Roberts, C. K.; Liang, K.; Barnard, R. J.; Kim, C. H.; Vaziri, N. D., 2004: HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X. *Kidney Int*, **66**, 1503-1511.
- Roberts, R.; Hodson, L.; Dennis, A. L.; Neville, M. J.; Humphreys, S. M.; Harnden, K. E.; Micklem, K. J.; Frayn, K. N., 2009: Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia*, **52**, 882-890.
- Robinson, J. G.; Stone, N. J., 2006: Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*, **98**, 39i-49i.
- Rocchini, A. P.; Marker, P.; Cervenka, T., 1997: Time course of insulin resistance associated with feeding dogs a high-fat diet. *Am J Physiol*, **272**, E147-154.
- Rocchini, A. P.; Yang, J. Q.; Gokee, A., 2004: Hypertension and insulin resistance are not directly related in obese dogs. *Hypertension*, **43**, 1011-1016.
- Ruan, H.; Lodish, H. F., 2003: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**, 447-455.

- Rubic, T.; Trottmann, M.; Lorenz, R. L., 2004: Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin. *Biochem Pharmacol*, **67**, 411-419.
- Rubin, E. M.; Krauss, R. M.; Spangler, E. A.; Verstuyft, J. G.; Clift, S. M., 1991: Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*, **353**, 265-267.
- Rye, K. A.; Hime, N. J.; Barter, P. J., 1995: The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem*, **270**, 189-196.
- Sabol, S. L.; Brewer, H. B., Jr.; Santamarina-Fojo, S., 2005: The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res*, **46**, 2151-2167.
- Samuel, V. T.; Petersen, K. F.; Shulman, G. I., 2010: Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, **375**, 2267-2277.
- Santamarina-Fojo, S.; Peterson, K.; Knapper, C.; Qiu, Y.; Freeman, L.; Cheng, J. F.; Osorio, J.; Remaley, A.; Yang, X. P.; Haudenschild, C.; Prades, C.; Chimini, G.; Blackmon, E.; Francois, T.; Duverger, N.; Rubin, E. M.; Rosier, M.; Deneffe, P.; Fredrickson, D. S.; Brewer, H. B., Jr., 2000: Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7987-7992.
- Schlitt, A.; Bickel, C.; Thumma, P.; Blankenberg, S.; Rupprecht, H. J.; Meyer, J.; Jiang, X. C., 2003: High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1857-1862.
- Schmitz, G.; Langmann, T., 2005: Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta*, **1735**, 1-19.
- Schoonjans, K.; Annicotte, J. S.; Huby, T.; Botrugno, O. A.; Fayard, E.; Ueda, Y.; Chapman, J.; Auwerx, J., 2002: Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Rep*, **3**, 1181-1187.
- Schultz, J. R.; Verstuyft, J. G.; Gong, E. L.; Nichols, A. V.; Rubin, E. M., 1993: Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature*, **365**, 762-764.
- Schwartz, C. C.; VandenBroek, J. M.; Cooper, P. S., 2004: Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *J Lipid Res*, **45**, 1594-1607.
- Schwarz, M.; Russell, D. W.; Dietschy, J. M.; Turley, S. D., 1998: Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 α -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **39**, 1833-1843.
- Scotet, E.; Martinez, L. O.; Grant, E.; Barbaras, R.; Jenou, P.; Guiraud, M.; Monsarrat, B.; Saulquin, X.; Maillet, S.; Esteve, J. P.; Lopez, F.; Perret, B.; Collet, X.; Bonneville, M.; Champagne, E., 2005: Tumor recognition following V γ 9V δ 2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity*, **22**, 71-80.
- Segrest, J. P.; Jones, M. K.; De Loof, H.; Dashti, N., 2001: Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res*, **42**, 1346-1367.
- Semple, G.; Skinner, P. J.; Gharbaoui, T.; Shin, Y. J.; Jung, J. K.; Cherrier, M. C.; Webb, P. J.; Tamura, S. Y.; Boatman, P. D.; Sage, C. R.; Schrader, T. O.; Chen, R.; Colletti, S. L.; Tata, J. R.; Waters, M. G.; Cheng, K.; Taggart, A. K.; Cai, T. Q.; Carballo-Jane, E.; Behan, D. P.; Connolly, D. T.; Richman, J. G., 2008: 3-(1H-tetrazol-5-yl)-1,4,5,6-

- tetrahydro-cyclopentapyrazole (MK-0354): a partial agonist of the nicotinic acid receptor, G-protein coupled receptor 109a, with antilipolytic but no vasodilatory activity in mice. *J Med Chem*, **51**, 5101-5108.
- Serhan, C. N., 2005: Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **8**, 115-121.
- Serhan, C. N.; Arita, M.; Hong, S.; Gotlinger, K., 2004: Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids*, **39**, 1125-1132.
- Serhan, C. N.; Clish, C. B.; Brannon, J.; Colgan, S. P.; Chiang, N.; Gronert, K., 2000a: Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, **192**, 1197-1204.
- Serhan, C. N.; Clish, C. B.; Brannon, J.; Colgan, S. P.; Gronert, K.; Chiang, N., 2000b: Anti-microinflammatory lipid signals generated from dietary N-3 fatty acids via cyclooxygenase-2 and transcellular processing: a novel mechanism for NSAID and N-3 PUFA therapeutic actions. *J Physiol Pharmacol*, **51**, 643-654.
- Serhan, C. N.; Hong, S.; Gronert, K.; Colgan, S. P.; Devchand, P. R.; Mirick, G.; Moussignac, R. L., 2002: Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, **196**, 1025-1037.
- Serisier, S.; Gayet, C.; Leray, V.; Le Bloc'h, J.; Ouguerram, K.; Magot, T.; Nguyen, P., 2008: Hypertriglyceridaemic insulin-resistant obese dog model: effects of high-fat diet depending on age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **92**, 419-425.
- Shaikh, S. R.; Cherezov, V.; Caffrey, M.; Stillwell, W.; Wassall, S. R., 2003: Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry*, **42**, 12028-12037.
- Shen, H. C., 2009: Acyl hydroxypyrazoles as novel agonists for high-affinity nicotinic acid receptor GPR109A: WO2008051403. *Expert Opin Ther Pat*, **19**, 1149-1155.
- Shepherd, J.; Packard, C. J.; Patsch, J. R.; Gotto, A. M., Jr.; Taunton, O. D., 1979: Effects of nicotinic acid therapy on plasma high density lipoprotein subfraction distribution and composition and on apolipoprotein A metabolism. *J Clin Invest*, **63**, 858-867.
- Silver, D. L.; Wang, N.; Xiao, X.; Tall, A. R., 2001: High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem*, **276**, 25287-25293.
- Simmonds, W. J.; Hofmann, A. F.; Theodor, E., 1967: Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *J Clin Invest*, **46**, 874-890.
- Simons, K.; Ikonen, E., 1997: Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Sinal, C. J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J. M.; Lambert, G.; Gonzalez, F. J., 2000: Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, **102**, 731-744.
- Sinclair, H. M., 1953: The diet of Canadian Indians and Eskimos. *Proc Nutr Soc*, **12**, 69-82.
- Singaraja, R. R.; Fievet, C.; Castro, G.; James, E. R.; Hennuyer, N.; Clee, S. M.; Bissada, N.; Choy, J. C.; Fruchart, J. C.; McManus, B. M.; Staels, B.; Hayden, M. R., 2002: Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest*, **110**, 35-42.

- Siripurkpong, P.; Na-Bangchang, K., 2008: Effects of niacin and chromium on the expression of ATP-binding cassette transporter A1 and apolipoprotein A-1 genes in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*.
- Sivitz, W. I.; DeSautel, S. L.; Kayano, T.; Bell, G. I.; Pessin, J. E., 1989: Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature*, **340**, 72-74.
- Sjogren, P.; Sierra-Johnson, J.; Gertow, K.; Rosell, M.; Vessby, B.; de Faire, U.; Hamsten, A.; Hellenius, M. L.; Fisher, R. M., 2008: Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia*, **51**, 328-335.
- Skinner, P. J.; Cherrier, M. C.; Webb, P. J.; Shin, Y. J.; Gharbaoui, T.; Lindstrom, A.; Hong, V.; Tamura, S. Y.; Dang, H. T.; Pride, C. C.; Chen, R.; Richman, J. G.; Connolly, D. T.; Semple, G., 2007: Fluorinated pyrazole acids are agonists of the high affinity niacin receptor GPR109a. *Bioorg Med Chem Lett*, **17**, 5620-5623.
- Sladek, F. M., 1994: *Liver gene expression*. R.G. Landers Compagny, Austin.
- Slater, S. J.; Kelly, M. B.; Taddeo, F. J.; Ho, C.; Rubin, E.; Stubbs, C. D., 1994: The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J Biol Chem*, **269**, 4866-4871.
- Soga, T.; Kamohara, M.; Takasaki, J.; Matsumoto, S.; Saito, T.; Ohishi, T.; Hiyama, H.; Matsuo, A.; Matsushime, H.; Furuichi, K., 2003: Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 364-369.
- Soutar, A. K.; Garner, C. W.; Baker, H. N.; Sparrow, J. T.; Jackson, R. L.; Gotto, A. M.; Smith, L. C., 1975: Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, **14**, 3057-3064.
- Spady, D. K.; Kearney, D. M.; Hobbs, H. H., 1999: Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res*, **40**, 1384-1394.
- Stange, E. F.; Dietschy, J. M., 1985: Cholesterol absorption and metabolism by the intestinal epithelium. In: S. DanielssonH., editors, (ed.) *Sterols and bile acids*. Elsevier Sciences Publishers New York
- Steppan, C. M.; Bailey, S. T.; Bhat, S.; Brown, E. J.; Banerjee, R. R.; Wright, C. M.; Patel, H. R.; Ahima, R. S.; Lazar, M. A., 2001: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, **409**, 307-312.
- Stillwell, W.; Wassall, S. R., 2003: Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids*, **126**, 1-27.
- Storlien, L. H.; Jenkins, A. B.; Chisholm, D. J.; Pascoe, W. S.; Khouri, S.; Kraegen, E. W., 1991: Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*, **40**, 280-289.
- Subbaiah, P. V.; Albers, J. J.; Chen, C. H.; Bagdade, J. D., 1980: Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*, **255**, 9275-9280.
- Sviridov, D.; Hoang, A.; Sawyer, W. H.; Fidge, N. H., 2000: Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of Lecithin:Cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*, **275**, 19707-19712.
- Syvanne, M.; Castro, G.; Dengremont, C.; De Geitere, C.; Jauhiainen, M.; Ehnholm, C.; Michelagnoli, S.; Franceschini, G.; Kahri, J.; Taskinen, M. R., 1996: Cholesterol efflux

- from Fu5AH hepatoma cells induced by plasma of subjects with or without coronary artery disease and non-insulin-dependent diabetes: importance of LpA-I:A-II particles and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*, **127**, 245-253.
- Taggart, A. K.; Kero, J.; Gan, X.; Cai, T. Q.; Cheng, K.; Ippolito, M.; Ren, N.; Kaplan, R.; Wu, K.; Wu, T. J.; Jin, L.; Liaw, C.; Chen, R.; Richman, J.; Connolly, D.; Offermanns, S.; Wright, S. D.; Waters, M. G., 2005: (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem*, **280**, 26649-26652.
- Tall, A. R., 1993: Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*, **34**, 1255-1274.
- Tan, K. C.; Cooper, M. B.; Ling, K. L.; Griffin, B. A.; Freeman, D. J.; Packard, C. J.; Shepherd, J.; Hales, C. N.; Betteridge, D. J., 1995: Fasting and postprandial determinants for the occurrence of small dense LDL species in non-insulin-dependent diabetic patients with and without hypertriglyceridaemia: the involvement of insulin, insulin precursor species and insulin resistance. *Atherosclerosis*, **113**, 273-287.
- Tato, F.; Vega, G. L.; Grundy, S. M., 1997: Determinants of plasma HDL-cholesterol in hypertriglyceridemic patients. Role of cholesterol-ester transfer protein and lecithin cholesteryl acyl transferase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 56-63.
- Taylor, A. J.; Sullenberger, L. E.; Lee, H. J.; Lee, J. K.; Grace, K. A., 2004: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation*, **110**, 3512-3517.
- Thompson, A.; Di Angelantonio, E.; Sarwar, N.; Erqou, S.; Saleheen, D.; Dullaart, R. P.; Keavney, B.; Ye, Z.; Danesh, J., 2008: Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA*, **299**, 2777-2788.
- Thomsen, C.; Rasmussen, O.; Lousen, T.; Holst, J. J.; Fenselau, S.; Schrezenmeir, J.; Hermansen, K., 1999: Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, **69**, 1135-1143.
- Tierney, A. C.; Roche, H. M., 2007: The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity. *Mol Nutr Food Res*, **51**, 1235-1248.
- Tornvall, P.; Olivecrona, G.; Karpe, F.; Hamsten, A.; Olivecrona, T., 1995: 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*, **15**, 1086-1093.
- Trayhurn, P.; Wang, B.; Wood, I. S., 2008: Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr*, **100**, 227-235.
- Tunaru, S.; Kero, J.; Schaub, A.; Wufka, C.; Blaukat, A.; Pfeffer, K.; Offermanns, S., 2003: PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*, **9**, 352-355.
- Tzotzas, T.; Desrumaux, C.; Lagrost, L., 2009: Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor. *Obes Rev*, **10**, 403-411.
- Ueda, Y.; Gong, E.; Royer, L.; Cooper, P. N.; Francone, O. L.; Rubin, E. M., 2000: Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics. *J Biol Chem*, **275**, 20368-20373.
- Urizar, N. L.; Dowhan, D. H.; Moore, D. D., 2000: The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 39313-39317.

- Utzschneider, K. M.; Carr, D. B.; Tong, J.; Wallace, T. M.; Hull, R. L.; Zraika, S.; Xiao, Q.; Mistry, J. S.; Retzlaff, B. M.; Knopp, R. H.; Kahn, S. E., 2005: Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia*, **48**, 2330-2333.
- Vaisman, B. L.; Lambert, G.; Amar, M.; Joyce, C.; Ito, T.; Shamburek, R. D.; Cain, W. J.; Fruchart-Najib, J.; Neufeld, E. D.; Remaley, A. T.; Brewer, H. B., Jr.; Santamarina-Fojo, S., 2001: ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest*, **108**, 303-309.
- van der Heide, J. J.; Bilo, H. J.; Donker, J. M.; Wilmlink, J. M.; Tegzess, A. M., 1993: Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. *N Engl J Med*, **329**, 769-773.
- van der Hoorn, J. W.; de Haan, W.; Berbee, J. F.; Havekes, L. M.; Jukema, J. W.; Rensen, P. C.; Princen, H. M., 2008: Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE*3Leiden.CETP mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 2016-2022.
- van Haperen, R.; van Tol, A.; Vermeulen, P.; Jauhiainen, M.; van Gent, T.; van den Berg, P.; Ehnholm, S.; Grosveld, F.; van der Kamp, A.; de Crom, R., 2000: Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1082-1088.
- Varming, K.; Schmidt, E. B.; Svaneborg, N.; Moller, J. M.; Lervang, H. H.; Grunnet, N.; Jersild, C.; Dyerberg, J., 1995: The effect of n-3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence. *Scand J Clin Lab Invest*, **55**, 47-52.
- Vaughan, A. M.; Oram, J. F., 2005: ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem*, **280**, 30150-30157.
- Vaughan, A. M.; Oram, J. F., 2006: ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res*, **47**, 2433-2443.
- Vedhachalam, C.; Liu, L.; Nickel, M.; Dhanasekaran, P.; Anantharamaiah, G. M.; Lund-Katz, S.; Rothblat, G. H.; Phillips, M. C., 2004: Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids. *J Biol Chem*, **279**, 49931-49939.
- Vega, G. L.; Cater, N. B.; Meguro, S.; Grundy, S. M., 2005: Influence of extended-release nicotinic acid on nonesterified fatty acid flux in the metabolic syndrome with atherogenic dyslipidemia. *Am J Cardiol*, **95**, 1309-1313.
- Venkateswaran, A.; Repa, J. J.; Lobaccaro, J. M.; Bronson, A.; Mangelsdorf, D. J.; Edwards, P. A., 2000: Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem*, **275**, 14700-14707.
- Verges, B., 2005: New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, **31**, 429-439.
- Vessby, B.; Gustafsson, I. B.; Tengblad, S.; Boberg, M.; Andersson, A., 2002: Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci*, **967**, 183-195.
- Villa, E.; Rabano, A.; Albarran, O. G.; Ruilope, L. M.; Garcia-Robles, R., 1998: Effects of chronic combined treatment with captopril and pravastatin on the progression of insulin resistance and cardiovascular alterations in an experimental model of obesity in dogs. *Am J Hypertens*, **11**, 844-851.
- Virraly, M., 2006: L'augmentation de la prévalence de l'obésité se confirme en France (Données ObEpi-Roche 2006). *Sang Thrombose Vaisseaux*, **18**, 520-521.

- Vrablik, M.; Prusikova, M.; Snejdrlava, M.; Zlatohlavek, L., 2009: Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease risk: do we understand the relationship? *Physiol Res*, **58 Suppl 1**, S19-26.
- Vrins, C. L.; Van der Velde, A. E.; Van den Oever, K.; Levels, J. H.; Huet, S.; Oude Elferink, R. P.; Kuipers, F.; Groen, A. K., 2009: PPAR α activation leads to increased trans intestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res*.
- Wahnon, R.; Cogan, U.; Mokady, S., 1992: Dietary fish oil modulates the alkaline phosphatase activity and not the fluidity of rat intestinal microvillus membrane. *J Nutr*, **122**, 1077-1084.
- Wang, C. S.; McConathy, W. J.; Kloer, H. U.; Alaupovic, P., 1985: Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest*, **75**, 384-390.
- Wang, D. Q.; Carey, M. C., 2003: 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*, **44**, 1042-1059.
- Wang, N.; Lan, D.; Chen, W.; Matsuura, F.; Tall, A. R., 2004: ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9774-9779.
- Wang, N.; Silver, D. L.; Thiele, C.; Tall, A. R., 2001a: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem*, **276**, 23742-23747.
- Wang, W.; Basinger, A.; Neese, R. A.; Christiansen, M.; Hellerstein, M. K., 2000: Effects of nicotinic acid on fatty acid kinetics, fuel selection, and pathways of glucose production in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **279**, E50-59.
- Wang, W.; Basinger, A.; Neese, R. A.; Shane, B.; Myong, S. A.; Christiansen, M.; Hellerstein, M. K., 2001b: Effect of nicotinic acid administration on hepatic very low density lipoprotein-triglyceride production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **280**, E540-547.
- Warden, C. H.; Hedrick, C. C.; Qiao, J. H.; Castellani, L. W.; Lusis, A. J., 1993: Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science*, **261**, 469-472.
- Warden, C. H.; Langner, C. A.; Gordon, J. I.; Taylor, B. A.; McLean, J. W.; Lusis, A. J., 1989: Tissue-specific expression, developmental regulation, and chromosomal mapping of the lecithin: cholesterol acyltransferase gene. Evidence for expression in brain and testes as well as liver. *J Biol Chem*, **264**, 21573-21581.
- Warensjo, E.; Riserus, U.; Gustafsson, I. B.; Mohsen, R.; Cederholm, T.; Vessby, B., 2008: Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **18**, 683-690.
- Webber, J., 2003: Energy balance in obesity. *Proc Nutr Soc*, **62**, 539-543.
- Werb, Z.; Chin, J. R.; Takemura, R.; Oropeza, R. L.; Bainton, D. F.; Stenberg, P.; Taylor, J. M.; Reardon, C., 1986: The cell and molecular biology of apolipoprotein E synthesis by macrophages. *Ciba Found Symp*, **118**, 155-171.
- Weyer, C.; Funahashi, T.; Tanaka, S.; Hotta, K.; Matsuzawa, Y.; Pratley, R. E.; Tataranni, P. A., 2001: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 1930-1935.
- WHO, 2004: Obesity : preventing and managing the global epidemic. *Report of a WHO consultation, Geneva, World Health Organization*.
- Wiersma, H.; Nijstad, N.; de Boer, J. F.; Out, R.; Hogewerf, W.; Van Berkel, T. J.; Kuipers, F.; Tietge, U. J., 2009: Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels

- and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, **206**, 141-147.
- Wilcox, G., 2005: Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, **26**, 19-39.
- Willy, P. J.; Mangelsdorf, D. J., 1997: Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev*, **11**, 289-298.
- Windler, E.; Havel, R. J., 1985: Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res*, **26**, 556-565.
- Wise, A.; Foord, S. M.; Fraser, N. J.; Barnes, A. A.; Elshourbagy, N.; Eilert, M.; Ignar, D. M.; Murdock, P. R.; Stepkowski, K.; Green, A.; Brown, A. J.; Dowell, S. J.; Szekeres, P. G.; Hassall, D. G.; Marshall, F. H.; Wilson, S.; Pike, N. B., 2003: Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem*, **278**, 9869-9874.
- Wolk, R.; Chen, D.; Clark, R. W.; Mancuso, J.; Barclay, P. L., 2009: Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Profile of a New Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibitor in Healthy Human Subjects. *Clin Pharmacol Ther*.
- Wood, I. S.; de Heredia, F. P.; Wang, B.; Trayhurn, P., 2009: Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*, **68**, 370-377.
- Woodman, R. J.; Mori, T. A.; Burke, V.; Puddey, I. B.; Barden, A.; Watts, G. F.; Beilin, L. J., 2003: Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*, **166**, 85-93.
- Xu, J.; Nakamura, M. T.; Cho, H. P.; Clarke, S. D., 1999: Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem*, **274**, 23577-23583.
- Yancey, P. G.; Bortnick, A. E.; Kellner-Weibel, G.; de la Llera-Moya, M.; Phillips, M. C.; Rothblat, G. H., 2003: Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 712-719.
- Yang, W. S.; Lee, W. J.; Funahashi, T.; Tanaka, S.; Matsuzawa, Y.; Chao, C. L.; Chen, C. L.; Tai, T. Y.; Chuang, L. M., 2001: Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 3815-3819.
- Yang, X. P.; Yan, D.; Qiao, C.; Liu, R. J.; Chen, J. G.; Li, J.; Schneider, M.; Lagrost, L.; Xiao, X.; Jiang, X. C., 2003: Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1601-1607.
- Yaqoob, P.; Calder, P., 1995: Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol*, **163**, 120-128.
- Yu, L.; Li-Hawkins, J.; Hammer, R. E.; Berge, K. E.; Horton, J. D.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H., 2002: Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*, **110**, 671-680.
- Yu, L.; York, J.; von Bergmann, K.; Lutjohann, D.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H., 2003: Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem*, **278**, 15565-15570.
- Zammit, V. A.; Buckett, L. K.; Turnbull, A. V.; Wure, H.; Proven, A., 2008: Diacylglycerol acyltransferases: Potential roles as pharmacological targets. *Pharmacol Ther*, **118**, 295-302.

- Zhang, L. H.; Kamanna, V. S.; Zhang, M. C.; Kashyap, M. L., 2008: Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *J Lipid Res*, **49**, 1195-1201.
- Zhang, Y.; Da Silva, J. R.; Reilly, M.; Billheimer, J. T.; Rothblat, G. H.; Rader, D. J., 2005: 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*, **115**, 2870-2874.
- Zhao, A.; Yu, J.; Lew, J. L.; Huang, L.; Wright, S. D.; Cui, J., 2004a: Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol*, **23**, 519-526.
- Zhao, S. P.; Yang, J.; Li, J.; Dong, S. Z.; Wu, Z. H., 2008: Effect of niacin on LXRAalpha and PPARgamma expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol*, **124**, 172-178.
- Zhao, Y.; Joshi-Barve, S.; Barve, S.; Chen, L. H., 2004b: Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr*, **23**, 71-78.
- Zhao, Y.; Thorngate, F. E.; Weisgraber, K. H.; Williams, D. L.; Parks, J. S., 2005: Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry*, **44**, 1013-1025.
- Zhong, S.; Goldberg, I. J.; Bruce, C.; Rubin, E.; Breslow, J. L.; Tall, A., 1994: Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J Clin Invest*, **94**, 2457-2467.

Modulation pharmacologique (acide nicotinique) et nutritionnelle (acides gras polyinsaturés oméga 3) du transport inverse du cholestérol chez le chien obèse et insulino-résistant.

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier, chez des chiens obèses et insulino-résistants, les caractéristiques du tissu adipeux en fonction de sa localisation anatomique. Nous avons montré que le tissu adipeux viscéral se caractérise par une plus grande teneur en acides gras saturés par comparaison au tissu adipeux sous-cutané, ainsi que par une expression plus importante de facteurs de l'inflammation et de l'hypoxie. Ces caractéristiques pourraient expliquer, au moins partiellement, la plus grande implication du tissu adipeux viscéral dans diverses affections telles que l'insulino-résistance ou la stéatose hépatique.

Nous avons ensuite évalué les effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 (EPA et DHA) sur différents paramètres du syndrome métabolique. Cette supplémentation a permis de corriger partiellement la dyslipidémie, notamment du fait d'une augmentation de l'oxydation des acides gras et d'une diminution de la lipogenèse. De plus, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline que nous avons observée pourrait avoir trouvé une part de son explication dans la modification de la composition en acides gras des tissus ainsi que dans l'augmentation de l'expression du PPAR γ .

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons cherché à moduler le transport inverse du cholestérol (TIC) en réduisant la triglycéridémie par l'utilisation d'acide nicotinique ou d'acides gras polyinsaturés oméga 3. D'une part, l'acide nicotinique exerce son activité en inhibant la synthèse hépatique de triglycérides mais, bien que ses effets sur le TIC soient dépendants de la CETP, nous avons mis en évidence une accélération de ce transport, accélération non soupçonnée chez l'Homme et qui pourrait participer à la réduction du risque cardiovasculaire. D'autre part, l'analyse des cinétiques de marquage de l'apoAI et du cholestérol après supplémentation en EPA et DHA devrait permettre de déterminer les effets de ces acides gras sur le TIC et de mieux comprendre la relation entre variation de la triglycéridémie et TIC.

Mots clés : chien, obésité, transport inverse du cholestérol, acide nicotinique, acide gras oméga 3.

Pharmacological (nicotinic acid) and nutritional (omega 3 polyunsaturated fatty acids) modulation of reverse cholesterol transport in obese insulin resistant dogs.

The first aim of this thesis was to assess, in obese and insulin resistant dogs, differences in the characteristics of adipose tissue depending on its anatomical position. We have shown that the content of saturated fatty acid was higher in visceral adipose tissue (VAT) than in subcutaneous adipose tissue. Similarly, the expression of inflammatory and hypoxic markers was higher in VAT. Together, these findings could partly explain the higher implication of VAT in some diseases.

We then aimed to determine the effects of omega 3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) (EPA and DHA) on the obesity-related dyslipidemia and insulin resistance. We have shown that EPA and DHA supplementation improved the dyslipidemia, notably by increasing fatty acid oxidation and reducing lipogenesis. Dogs also presented a higher insulin sensitivity that could be explained by the modification of tissues fatty acid composition and the higher expression of PPAR γ .

The last step of this thesis was to evaluate the effect of a lowered triglyceridemia (by using nicotinic acid (NA) or omega 3 PUFA) on reverse cholesterol transport (RCT). Firstly, NA reduced plasma triglyceride concentration by inhibiting hepatic triglyceride synthesis. Even if NA exerts its effects on RCT mainly through CETP, we have observed an improved RCT in dogs, mainly due to an increase in cholesterol esterification rate and cholesteryl ester uptake. Secondly, the analysis of apoAI and cholesterol kinetics during the EPA and DHA supplementation period are being conducted. They could allow to determine the effects of these fatty acids on RCT, and get a better understanding about the relationship between changes in triglyceridemia and RCT.

Key words: dog, obesity, reverse cholesterol transport, nicotinic acid, omega 3 fatty acids.