

Université de Montréal

**Contribution différentielle du tissu adipeux mâle et
femelle dans l'établissement du diabète de type 2 et des
altérations cardiovasculaires: rôle de l'apport lipidique.**

par

Souhad El Akoum

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

option Sciences Biomédicales

Septembre 2011

© Souhad El Akoum, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Contribution différentielle du tissu adipeux mâle et femelle dans l'établissement du diabète
de type 2 et des altérations cardiovasculaires: rôle de l'apport lipidique.

Présentée par :
Souhad El Akoum

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau, président-rapporteur
Dr Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dr Hélène Girouard, membre du jury
Dr Paul Poirier, examinateur externe
Dr Daniel Lajeunesse, représentant du doyen de la FES

Résumé

Au cours des dernières années, il est devenu évident que les sociétés des pays industrialisés sont à haut risque de maladies métaboliques. Une alimentation riche en énergie (lipide/glucide), combinée à une sédentarité accrue, est un facteur environnemental contribuant à l'augmentation de la prévalence de maladies reliées spécifiquement à des troubles endocriniens comme l'obésité et le diabète. Le traitement de ces désordres métaboliques doit donc passer par la connaissance et la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent ces désordres et le développement de traitements ciblés vers les facteurs responsables.

Le tissu adipeux est une glande endocrine qui sécrète des substances, regroupées sous le terme d'adipokines, qui contrôlent l'homéostasie énergétique. L'augmentation de la masse adipeuse est responsable du développement de dérégulation hormonale qui mène à des dysfonctions physiologiques et métaboliques. Pour contrecarrer le développement démesuré du tissu adipeux, la signalisation insulinique ainsi que l'apport énergétique, responsables de la différenciation adipocytaire, doivent être inhibés. *In vivo*, la leptine, adipokine dont la concentration est corrélée à la masse adipeuse, présente des actions pro ou anti-insuliniques dans l'organisme pour réguler ce phénomène. Elle favorise l'effet inhibiteur de l'insuline sur la synthèse hépatique de glucose alors qu'elle s'oppose à son action sur l'expression des enzymes glucokinase et phosphoénol-pyruvate carboxykinase. La leptine influence aussi le taux circulant de triglycérides en diminuant sa concentration plasmatique. D'autre part, l'adiponectine, adipokine insulino-sensibilisante, voit sa sécrétion diminuée avec la prise de poids. La sensibilité à l'insuline est ainsi diminuée au fur et à mesure que le débalancement de ces deux adipokines s'accroît.

La résistance à l'insuline s'installe alors pour s'opposer au stockage énergétique et à la prise illimitée de poids et la glycémie augmente. L'augmentation du glucose sanguin stimule la sécrétion d'insuline au niveau des cellules pancréatiques. C'est le diabète caractérisé par une hyperglycémie et une résistance à l'insuline. Le diabète, une des

premières causes de mortalité dans le monde, est plus répandu sous sa forme non insulino-dépendante (diabète de type 2, DT2) liée à l'obésité.

Récemment, différents facteurs de transcription ont été identifiés comme régulateurs de l'expression d'une panoplie de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique. Parmi eux, les récepteurs des inducteurs de la prolifération des peroxyosomes (PPAR, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. Les PPAR ont été démontrés comme ayant un rôle central dans le contrôle de la transcription des gènes codants pour des protéines impliquées dans le métabolisme : les adipokines. PPAR γ , en plus de son implication dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et lipidique, est reconnu comme étant un facteur de transcription pivot régulant l'adipogenèse du fait de son expression majeure dans le tissu adipeux.

D'autre part, il est bien établi maintenant que l'obésité et le diabète sont des facteurs contribuant au développement du processus inflammatoire vasculaire caractéristique de l'athérosclérose. En effet, les cellules endothéliales et musculaires lisses, principales composantes de la média de l'artère, sont très sensibles aux altérations métaboliques. Une diminution de la sensibilité à l'insuline entraîne une réduction de la disponibilité du glucose et l'utilisation des acides gras comme alternatif par ces cellules. Ceci induit l'accumulation des acides gras oxydés dans l'intima et leur filtration dans la média pour former un core lipidique. Bien que l'induction de la dysfonction endothéliale soit impliquée très précocement, certaines études pointent l'accumulation lipidique dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) et leur dysfonction comme déclencheurs de l'athérosclérose.

Ce travail visait donc, dans un premier temps, à développer un modèle d'altérations métaboliques liées à la modulation de l'activité du tissu adipeux via une alimentation riche en lipides. Dans un second temps, cette étude tentait d'évaluer l'impact des adipocytes de souris sur les CML vasculaires et sur la modulation de leurs fonctions dans ce modèle d'altérations métaboliques et DT2 liés à l'alimentation et à l'obésité.

Ainsi, par le biais de deux diètes pauvres en cholestérol à profil lipidique différent, nous avons développé un modèle murin présentant divers stades d'altérations du

métabolisme allant jusqu'au DT2 en lien avec l'obésité chez les mâles et chez les femelles. D'autre part, des signes de cardiomyopathie ainsi qu'une modulation du taux des adipokines sont reliés à ces mêmes diètes. Parallèlement, l'activité de PPAR γ 2 est modulée chez les souris sous diètes enrichies en gras. Ensuite, nous avons démontré que les adipocytes, provenant de souris alimentées avec une diète enrichie en gras, modulaient la migration et la prolifération des CML comparativement au groupe contrôle. Ces modulations dépendaient en grande partie de la nature de la diète consommée, mais également du sexe de la souris. Par ailleurs, les altérations fonctionnelles des CML, couplées à des modulations géniques, sont associées aux changements du profil de sécrétion des adipokines mesurées chez les adipocytes.

L'ensemble de ces travaux suggère une action directe de la nature de la stimulation du tissu adipeux blanc dans la modulation du profil de sécrétion des adipokines et l'induction du DT2 *in vivo*. Ces altérations de la physiologie adipocytaire se reflètent *in vitro* où le tissu adipeux contribue aux altérations physiopathologiques des CML liées au DT2. Ainsi, cette étude est l'une des premières à établir un lien direct entre les modulations adipocytaires et les effets de leurs sécrétions sur la physiologie des CML. Ces observations peuvent être exploitées cliniquement dans un développement futur d'outils thérapeutiques visant à prévenir et à traiter les troubles métaboliques et le DT2, en ciblant le tissu adipeux comme entité métabolique et endocrine.

Mots-clés : adipocyte, adipokines, athérosclérose, diabète, obésité.

Abstract

Obesity is recognized as a risk factor to a variety of chronic diseases linked to the metabolic syndrome like atherosclerosis and type 2 diabetes (T2D), and is a major cause of increased risk of morbidity and mortality worldwide. High fat diets (HFD) coupled with sedentarity in the industrialized societies contribute to the raise of metabolic alterations prevalence specifically linked to endocrine troubles. Treatment of these latter should include the comprehension of the molecular mechanisms underlying these disorders in order to appropriately target factors responsible for the disease establishment.

Adipose tissue is no longer considered as a passive organ which only stores lipids, but also works as an active gland that secretes several bioactive substances called adipokines. Among them, there are key factors known to play a pivotal role in the regulation of glucose and lipid homeostasis, lipid storage, adipogenesis. They are also recognized for their control of a wide range of cell type like adipocytes, hepatocytes and skeletal myocytes. Accumulation of adipose tissue in obesity, linked with the type as much as the amount of dietary lipids, is due to hyperplasia and hypertrophy of adipocytes. These changes are associated with modification in their secretion and inflammatory profile. To counteract excessive fat tissue development, insulin signalling known for its role in adipogenesis is inhibited. Thus, leptin is secreted by adipocytes to inhibit insulin action and the insulin sensitizer adipokine, adiponectin, is down regulated. The two factors are correlated to weight gain and their respective secretion profile is upregulated for leptin and down regulated for adiponectin.

Insulin resistance is developed to prevent energetic storage and unlimited weight gain but glycemic control fails and glycaemia raises. Hyperglycaemia stimulates more insulin secretion, a characteristic of T2D linked to obesity. An estimated 80% of those who develop T2D are obese.

Obesity induces important and complex changes, not only in glycemic homeostasis but also in the adipocytes. Following fatty acids (FA) stimulation, the main ligand-activated transcriptional factor that controls adipose tissue metabolism and adipokine secretion, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), is

activated. This nuclear receptor subtype regroups two isoforms: PPAR γ 1, expressed in many tissues (adipose tissue, muscle, heart and liver) where it controls glucose and lipid homeostasis, and PPAR γ 2, the adipocyte's specific form, which further governs preadipocyte differentiation, up-regulation of genes involved in lipogenesis and the expression of adipokines.

Recent advances showed that increased FA and glycaemia trigger vascular alterations that lead to atherosclerosis. In fact, endothelial cells (EC) and smooth muscle cells (SMC), the main arterial components, are sensitive to metabolic alterations. A lack in insulin sensitivity, leading to lower glucose availability, forces arterial cells to use FA as alternative energy source. Thus, in atheroprone regions susceptible to plaque formation, EC and SMC are subjected to metabolic modifications that lead to oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) accumulation in the intima and the progression of vascular disease. Many studies confirmed that the presence of SMC in the atherosclerotic plaque originates from the vascular wall but are showing a distinct phenotype. Even if the role of these cells in atherogenesis is not clear, trans-differentiation of SMC into foam cells has been reported *in vitro*.

Thus, the present study aims at studying a HFD-induced obesity mouse model, developed to evaluate the impact of FA nature on the adipokine secretion profile of adipocytes. We also intended to determine gender-specific impact on modulation of metabolic disorders in response to those diets. On the other hand, we aim to determine the role of adipocytes in the development of obesity-linked atherosclerosis. For that, the second part of this study targeted the effect of adipocytes isolated from mice fed with HFD on SMC physiology. We focused our investigation on the effects of adipocytes regardless of the impact of other cell types in the adipose tissue.

To reach our goal, we developed a HFD-fed mouse preparation demonstrating different stages of metabolic disorders leading to T2D. This model allowed us to generate adipocytes with different alteration status, reflected by the modulation of their adipokine secretion profile. Modifications in adipokine secretions were associated with PPAR γ 2 modulation. These results, reported in both genders, were delayed in female who expressed higher levels of estrogen receptor alpha (ER α). Then, the adipocytes were used

to produce conditioned cultured media. To decipher the mechanistic contributions of HFD in adipokines modulation, the potential of adipocytes to induce SMC pathophysiologic disorders was evaluated in SMC stimulated by conditioned cultured media.

This protocol enables the transposition of diet-induced fat cell modifications into extended alterations in the physiology of vascular SMC. These results strongly support pro-atherogenic effects of abdominal adipocytes on an important vascular component function through paracrine actions. Thus, adipocytes can be recognized as a link between the pathogenic potential of obesity and the impairments of SMC functions.

A better understanding of the pathogenic effects of the adipose tissue on other tissues and organ systems might assist to develop better strategies in treating obesity-induced cardiovascular disease and metabolic syndrome.

Keywords : adipocyte, adipokines, atherosclerosis, diabetes, obesity.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
Avant-propos.....	1
Chapitre I. INTRODUCTION.....	2
I. Structure et fonctions de l'artère.....	3
A. Structure de la paroi artérielle.....	3
1. L'endothélium.....	5
2. Les cellules musculaires lisses vasculaires.....	8
3. La matrice extracellulaire des artères.....	9
B. Pathogénèse de l'athérosclérose.....	9
1. La dysfonction endothéliale.....	10
2. Les effets physiopathologiques de la dysfonction endothéliale.....	13
3. La genèse de la plaque et sa rupture.....	14
4. Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires.....	16
II. Le diabète.....	18
A. Concepts généraux du métabolisme.....	18
1. Le glucose.....	18
2. L'insuline.....	22
B. Le diabète.....	27
1. Le diabète de type 1.....	29
2. Le diabète de type 2.....	30
3. Le diabète de type MODY.....	32
4. Les autres types de diabète.....	33
C. Les facteurs de risque du diabète.....	34
D. Les atteintes liées au diabète.....	34
1. Le diabète et l'athérosclérose.....	34

2.	La rétinopathie diabétique	35
3.	La néphropathie diabétique	35
4.	La neuropathie diabétique	36
E.	Les traitements du diabète.....	36
1.	Les thiazolidinediones	36
2.	Les biguanides (metformine).....	37
3.	Les autres types de traitement	37
III.	Le tissu adipeux et PPAR γ	38
A.	Le tissu adipeux.....	38
1.	La physiologie du tissu adipeux	38
2.	L'adipocyte et le stockage lipidique	42
3.	Métabolisme lipidique	43
4.	L'adipogenèse.....	45
B.	Les PPAR.....	49
1.	Historique	49
2.	Les récepteurs nucléaires.....	50
3.	Mode d'action des récepteurs nucléaires.....	51
4.	La famille des PPAR	52
5.	PPAR et le tissu adipeux	54
6.	Les adipokines	55
7.	PPAR et contrôle de l'inflammation	59
8.	PPAR γ et l'athérosclérose	60
9.	Contrôle des PPAR par les hormones sexuelles.....	60
	Chapitre II. PROBLÉMATIQUE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE	62
	Chapitre III. CONTRIBUTIONS ORIGINALES.....	64
IV.	Nature of Fatty Acids in High Fat Diets Differentially Delineates Obesity-Linked Metabolic Syndrome Components in Male and Female C57BL/6J Mice	65
A.	Abstract	66
B.	Introduction	67
C.	Research Design and Methods	68
1.	Experimental protocol	68
2.	Intra-Peritoneal glucose tolerance test.....	68
3.	Physiological analyses.....	68
4.	Biochemical analyses	69

5.	Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR).....	69
6.	Quantitative real-time PCR (Q-PCR).....	69
7.	Statistical Analyses.....	70
D.	Results.....	71
1.	Weight gain and adipose tissue development.....	71
2.	Glycemic parameters.....	72
3.	Biochemical blood analysis.....	72
4.	Adipokine mRNA expression levels.....	73
5.	Cardiac parameters.....	74
E.	Discussion.....	74
F.	Conclusions.....	79
G.	Appendix.....	79
H.	References:.....	81
I.	Table & figure legends.....	85
V.	Adipocytes from male and female mice fed with high-fat-diets, differently alter vascular smooth muscle cells phenotype.....	93
A.	Abstract.....	94
B.	Introduction.....	94
C.	Materials and Methods.....	95
1.	Experimental protocol.....	96
2.	Adipocyte culture.....	96
3.	VSMC culture.....	96
4.	Cell proliferation assays.....	97
5.	Cell migration assay.....	97
6.	Quantification of mRNA level.....	97
7.	Caspase-3 activity.....	98
8.	Biochemical assay.....	98
9.	Statistical Analysis.....	98
D.	Results.....	99
1.	Effects of AdS on VSMC proliferation.....	99
2.	Effects of AdS on VSMC migration.....	100
3.	Gene expression.....	100
4.	VSMC apoptosis induction by AdS stimulation.....	101
5.	Biochemical characteristics.....	102
E.	Discussion.....	103

F.	Supplementary data.....	106
1.	Immunocytochemical characterization of VSMC	106
2.	Gene expression.....	106
G.	Appendix	107
H.	References	108
I.	Tables and Figures	111
VI.	Résultats supplémentaires.....	124
	Chapitre IV. DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSIONS.....	128
VII.	Choix du modèle animal	129
VIII.	Choix du modèle cellulaire	131
IX.	Modèle animal d'obésité et d'altérations métaboliques.....	133
A.	Rôle du genre dans l'établissement de ce modèle	133
B.	Rôle de la nature lipidique des diètes dans les altérations métaboliques	137
C.	L'insulino résistance et l'activité adipocytaire.....	141
X.	La cardiomyopathie diabétique des souris.....	143
XI.	Modèle cellulaire de milieu conditionné.....	144
A.	Influence des diètes	145
B.	Conditions de cultures des adipocytes et leurs effets sur les cellules musculaires lisses	146
1.	Adipocytes non stimulés.....	147
2.	Stimulation en condition d'hyper insulinémie	150
3.	Stimulation en condition d'hyperglycémie ou de diabète de type 2	153
XII.	Conclusion et perspectives.....	156
XIII.	Et si tout commençait par la fin... ..	158
XIV.	Épilogue	160
	Chapitre V. BIBLIOGRAPHIE	161

Liste des tableaux

Tableau 1- 1 Agents actifs sécrétés par les cellules endothéliales.....	5
Table 4- 1 Diets compositions	86
Table 4- 2 Alteration in cardiac parameters.....	87
Table 5- 1 In vivo mice parameters	113
Table 5- 2 AdS adiponectin & leptin secretion level.....	114
Table 5- 3 Specific primers sequence	115
Table 5- 4 Bax and FAS mRNA expression levels.....	116
Tableau 6- 1 Adipocytes extraits de souris mâles et femelles tels que visualisés au microscope	124
Tableau 6- 2 Cellules musculaires lisses après traitement avec les surnageants des adipocytes	126

Liste des figures

Figure 1- 1 Structure d'un vaisseau sanguin.....	4
Figure 1- 2 Cycle de production du NO et de son action sur les cellules musculaires lisses	7
Figure 1- 3 Développement de la lésion athérosclérotique (57).....	12
Figure 2- 1 Vue d'ensemble de la glycolyse.....	19
Figure 2- 2 Hydrolyse du glycogène.....	21
Figure 2- 3 Principales étapes de la sécrétion et de l'action de l'insuline.	23
Figure 2- 4 Voies de signalisations de l'insuline (155).	26
Figure 2-5 Paramètres de caractérisation du diabète (171; 172).....	29
Figure 2-6 Évolution du diabète (176; 177).....	31
Figure 3- 1 Distribution du tissu adipeux dans l'organisme (220).	39
Figure 3- 2 Stockage et mobilisation des lipides dans les adipocytes (237)	43
Figure 3- 3 Modèle de développement du tissu adipeux (220; 244).....	46
Figure 4- 1 Kinetic of weight gain.....	88
Figure 4- 2 Glycemic parameters.....	89
Figure 4- 3 Adipokines secretion profile	90
Figure 4- 4 Adipokines genes expression profile	91
Figure 4- 5 TNF α gene expression profile.....	92
Figure 5- 1 VSMC proliferation and migration	117
Figure 5- 2 CD36 scavenger receptor mRNA expression level in AdS-treated VSMC.	118
Figure 5- 3 Caspase-3 activity in AdS-treated VSMC reflected by the p-nitroalanilide concentration.....	119
Figure 5- 4 VSMC Immunocytochemical characterization	121
Figure 5- 5 VSMC control treatments	122
Figure 5- 6 VSMC InsR mRNA expression level	123

Liste des abréviations

ACAT	acyl-CoA:cholestérol acyltransférase
ACS	acyl-CoA synthase
ADA	American Diabetes Association
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AG	Acides Gras
AGL	Acides Gras Libres
AGE	Advanced Glycation End-products
AGPAT	1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase
AHA	American Heart Association
AMPc	Adénosine 5'-MonoPhosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
ANF	Atrial Natiuretic Factor
ALBP ou aP2	Adipocyte Lipid Binding Protein
Apo A	Apolipoprotéine A
Apo B	Apolipoprotéine B
Apo E	Apolipoprotéine E
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASP	Acylation Stimulating Protein
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
AUC	Area Under the Curve
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BSA	Bovin Seric Albumin
BSDL	Bile Salt Dependent Lipase
Ca ²⁺	Ions calcium
CDA	Canadian Diabetes Association
CE	Cellules Endothéliales
CML	Cellules Musculaires Lisses
coll.	Collaborateurs
CYP	Cytochrome P450
DA	Diète enrichie en matières grasses Animales
DAG	DiAcylGlycérol
DGAT	DAG AcylTransférase
DS	Diète Standard
DT1	Diabète de Type 1

DT2	Diabète de Type 2
DV	Diète enrichie en matières grasses Végétales
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
eNOS	endothelial Nitric Oxyde Synthase
ER α	Estrogen Receptor α
ER β	Estrogen Receptor β
ET-1	Endothéline-1
FA	Fatty Acid
FATP4	Fatty Acids -Transport Protein-4
FBS	Foetal Bovin Serum
FIAF	Fasting Induced Adipose Factor
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
GLUT	Transporteur de glucose (GLUT1 à GLUT12 et GLUT14)
GMPc	Guanosine 5'-MonoPhosphate cyclique
GPAT	Glycérol-3-Phosphate AcylTransférase
GRB-2	Growth factor Receptor-Bound protein-2
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HbA1C	Hémoglobine glyquée
HDL	High Density Lipoprotein
HFD	High Fat Diet
I.P.	Intra-péritonéal
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IFABP	Intestinal Fatty Acids Binding Protein
IFG	Impaired Fasting Glucose
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IGF-1R	Insulin Growth Factor-1 Receptor
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IKK β	Inhibitor of NF κ B Kinase
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine-6
INF- γ	Interféron-gamma
iNOS	inductible Nitric Oxyde Synthase
IP-3	Inositol-3-phosphate
IR	Insulin Receptor
IRS	Insulin Receptor Substrat
JNK	Jun Kinase
LADA	Late Autoimmune Diabetes of the Adult
LDL	Low-Density Lipoprotein

LPL	Lipoprotéine Lipase
MAG	MonoAcylGlycérol
MCP-1	Monocyte Colony Protein-1
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MGAT	MAG AcylTransférase
MMP	Matrix MetalloProteinase
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
nNOS	neuronal Nitric Oxyde Synthase
NO	Nitric Oxyde
NOS	Nitric Oxyde Synthase
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
oxLDL	oxydized Low-Density Lipoprotein
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAP	Phosphohydrolase Acide-Phosphatidique
PC1	Plasma-Cell-membrane glycoprotein-1
PDK-1	PI3K Dependent Kinase-1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEPCK	PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PKB	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-phosphate Kinase
PPAR α , β/δ , γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
PTB	Phospho-Tyrosine Binding
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome ten
PTP	Protein Tyrosine Phosphatases
RBP-4	Retinol Binding Protein 4
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
SEM	Standard Error to the Mean
SH2	Src-Homology-2
Shc	Src-homology-2-containing protein
SHIP	Src Homology 2 domain-containing Inositol 5-Phosphatase
SMC	Smooth Muscle Cells
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
T2D	Type 2 Diabetes

TAG	TriAcylGlycérol
TGF- β	Tumor Growth Factor bêta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TZD	Thiazolidinedione
UCP-1	UnCoupling Protein-1
UV	Ultra-Violets
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

*Les bons moments ont une fin...il faut être intelligent pour les vivre;
Les mauvais moments ont aussi une fin...il faut être patient pour les survivre.*

Remerciements

Je profite de l'occasion présente pour exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de guider et de juger ce travail.

Merci au **Docteur Jean-François Tanguay** pour m'avoir permis de m'intégrer au sein de son laboratoire et de m'avoir apporté son soutien, aussi bien scientifique que personnel, pendant ces trois dernières années. Votre confiance m'honore d'autant plus que j'ai pour vous un profond respect et une très grande considération. Veuillez agréer l'expression de ma profonde reconnaissance. Ce fut un réel plaisir de découvrir la recherche fondamentale au sein de votre équipe.

Merci à la **Docteure Isabelle Cloutier** qui a contribué au développement de la thématique de mes travaux. Isabelle, je te remercie chaleureusement pour ton soutien. Merci pour les longues discussions que nous avons eues et pour les précieux conseils aux bons moments. Merci pour ta bonne humeur, ta douceur pour passer les messages et ta disponibilité quand j'avais besoin d'un coup de pouce dans le dos. Tu avais toujours un mot réconfortant à me dire.

Je profite également de cette occasion pour remercier toutes **les personnes de mon entourage au laboratoire et à l'Institut de Cardiologie de Montréal**. Je souhaite qu'elles trouvent dans ces quelques mots toute mon affection et ma sincérité. Merci pour votre amitié et votre franchise. Vous étiez toujours là pour me soutenir dans mes moments de déprime mais également dans les moments de joie. Merci pour toutes les discussions, les pauses café. Nous avons partagé beaucoup de choses qu'il serait difficile de résumer en quelques mots. Je vous remercie pour cette complicité que nous avons et cette amitié que nous avons bâtie.

Mes plus forts et plus chaleureux remerciements vont à ma famille. Sans leur soutien depuis le début de mes études, je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui. Je pense en particulier :

À **ma mère et mon père** pour leur amour, leur soutien inconditionnel et tout simplement pour les personnes fantastiques qu'ils sont. A toi maman, merci de ta présence, de ton amour et de tes prières. A toi papa, qui n'a pas tenu sa promesse de ne plus me poser de questions sur l'évolution de ma thèse. Merci du plus profond de mon cœur pour tes encouragements.

À mes deux frères, *Alàa* et *Jad*, dont le soutien n'a pas été négligeable, surtout pour me faire passer des moments de fou-rires sur internet.

À mon adorable et bien aimée épouse, *Farah*, qui a cru en moi et en mes capacités et qui a supporté mes humeurs changeantes jusqu'au bout surtout pendant la période de rédaction. Quand on s'engage, tout devient possible.

À mon petit ange, *Nadim*, qui m'a aidé à me changer les idées et à supporter le stress malgré son jeune âge.

Finalement, je remercie en premier et en dernier "*Dieu*" qui m'a inspiré foi, patience et espérance tout au long de ma vie.

Avant-propos

Le sang est le tissu vital de tout organisme vivant. Comme un volcan incandescent qui fait ressortir les matériaux indispensables du fond de la terre jusqu'à sa surface vivante, le sang distribue aux cellules de l'organisme tout ce dont elles ont besoin pour leurs activités métaboliques et vitales, et les débarrasse de leurs différents déchets. Nos ancêtres voyaient en cette source vitale un élixir à propriétés magiques et mystérieuses qui emportait la vie avec elle en sortant d'un organisme vivant. Un organe en absence partielle ou totale de sang présente des dysfonctions pouvant mener à la mort du tissu, voire de l'organisme. L'une des altérations pouvant conduire à une absence d'apport sanguin dans un tissu est l'athérosclérose. Les complications résultant de la formation d'une plaque lipidique obstruant les vaisseaux vont à l'encontre des fonctions sanguines et entraînent de sévères événements pathologiques tels le syndrome coronarien, la cardiomyopathie ischémique et l'accident cérébro-vasculaire. Ces complications sont responsables de la majorité des cas de morbi-mortalité reliées aux maladies cardiovasculaires.

Par ailleurs, l'adoption d'un style de vie « aisée » est à l'origine de l'augmentation de la prévalence de l'athérosclérose dans toutes les régions du monde. En effet, les sociétés où l'industrialisation, l'alimentation énergétique, le mode de vie facile et la sédentarité prédominent voient leurs populations devenir obèses et diabétiques, deux facteurs de risques de l'athérogénèse. Heureusement, les complications de l'athérosclérose ont diminué ces 30 dernières années grâce aux progrès de la prévention des facteurs de risque et aux perfectionnements des thérapies médicamenteuses et interventionnelles.

Cependant, entre un changement radical du mode de vie et des habitudes des sociétés industrialisées et la recherche de traitement pour les maladies cardiovasculaires tout en étudiant l'impact des facteurs de risque, tel que le diabète et l'obésité, le débat n'est pas encore clos. En attendant l'évolution des sociétés vers des modes de vie plus « salubres », la découverte de nouvelles données scientifiques dans le processus d'athérosclérose permettra de mieux concevoir de nouveaux outils de prévention, de diagnostic et de traitement, mieux adaptés à nos sociétés contemporaines.

Chapitre I. INTRODUCTION

I. Structure et fonctions de l'artère

Les vaisseaux sanguins sont des structures anatomiques dynamiques qui véhiculent et régulent la distribution du sang, tissu indispensable pour la survie de l'organisme, en se contractant et en se relâchant suivant l'état physiologique du corps. Ils peuvent aussi proliférer pour irriguer de nouvelles parties de l'organisme en développement. Les vaisseaux sanguins forment un réseau qui prend fin là où il a pris naissance : dans le cœur. Ils se divisent en trois grandes catégories : les artères, les veines et les capillaires. Les contractions cardiaques génèrent la dynamique du sang dans ce réseau de conduits. Le sang passe ainsi du ventricule gauche du cœur dans les artères jusqu'aux artérioles pour atteindre le lit capillaire des organes et des tissus. À la sortie des capillaires, le sang emprunte les veinules puis les veines pour aboutir dans l'oreillette droite du cœur. Ce voyage, long de près de 10 000 km dans le corps humain adulte (1), redémarre vers les poumons pour permettre au sang de se débarrasser du CO₂ et de se recharger en O₂, indispensable à la survie de l'organisme.

A. Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle est anatomiquement et physiologiquement formée de trois tuniques entourant la lumière des vaisseaux où circule le sang (Figure 1-1) :

- La tunique externe, appelée adventice ou externa, est formée principalement de fibres élastiques et de fibres de collagène lâchement entrelacées, qui forment la protection du vaisseau (1). Cette couche est parcourue de neurofibres et de vaisseaux lymphatiques. Les artères reçoivent leurs substances nutritives par diffusion à partir de la lumière vasculaire, mais aussi grâce à de petits vaisseaux nommés *vasa vasorum* (1).
- La tunique moyenne, ou média, se compose principalement de cellules musculaires lisses (CML) disposées en anneaux, de fibres élastiques et de feuillettes d'élastine continus (1). Le système nerveux sympathique module l'activité du muscle lisse vasculaire entre contractions et relâchements, pour permettre la vasoconstriction et la vasodilatation, selon les besoins de l'organisme (2). La média est la couche la plus épaisse de la structure des artères qui participe au contrôle de la pression sanguine au niveau des organes (1).
- La tunique interne, ou intima, est composée d'un endothélium et d'une membrane basale. L'endothélium est un épithélium simple squameux qui tapisse la paroi interne des vaisseaux et qui est en contact avec le sang (1). En continuité avec l'endocarde,

les cellules endothéliales (CE) s'imbriquent les unes aux autres pour constituer une surface lisse et limiter les frictions avec le sang (1). Elles sont fixées sur la membrane basale par des molécules d'adhésion appelées intégrines. Dans les parties épaisses des vaisseaux sanguins où la diffusion passive des matières nutritives à partir de la lumière artérielle vers l'adventice est quasi impossible, des structures appelées *vasa vasorum* adventitiels s'étendent à la média et à l'intima pour leur fournir les nutriments (3).

À chaque compartiment correspondent des interactions spécifiques. Le compartiment endothélial interagit avec le sang circulant, le compartiment adventiciel avec le tissu environnant et la média, contenant les CML, perçoit des communications provenant de l'endothélium, des terminaisons nerveuses adventitielles et des peptides interstitiels vers les CML (4).

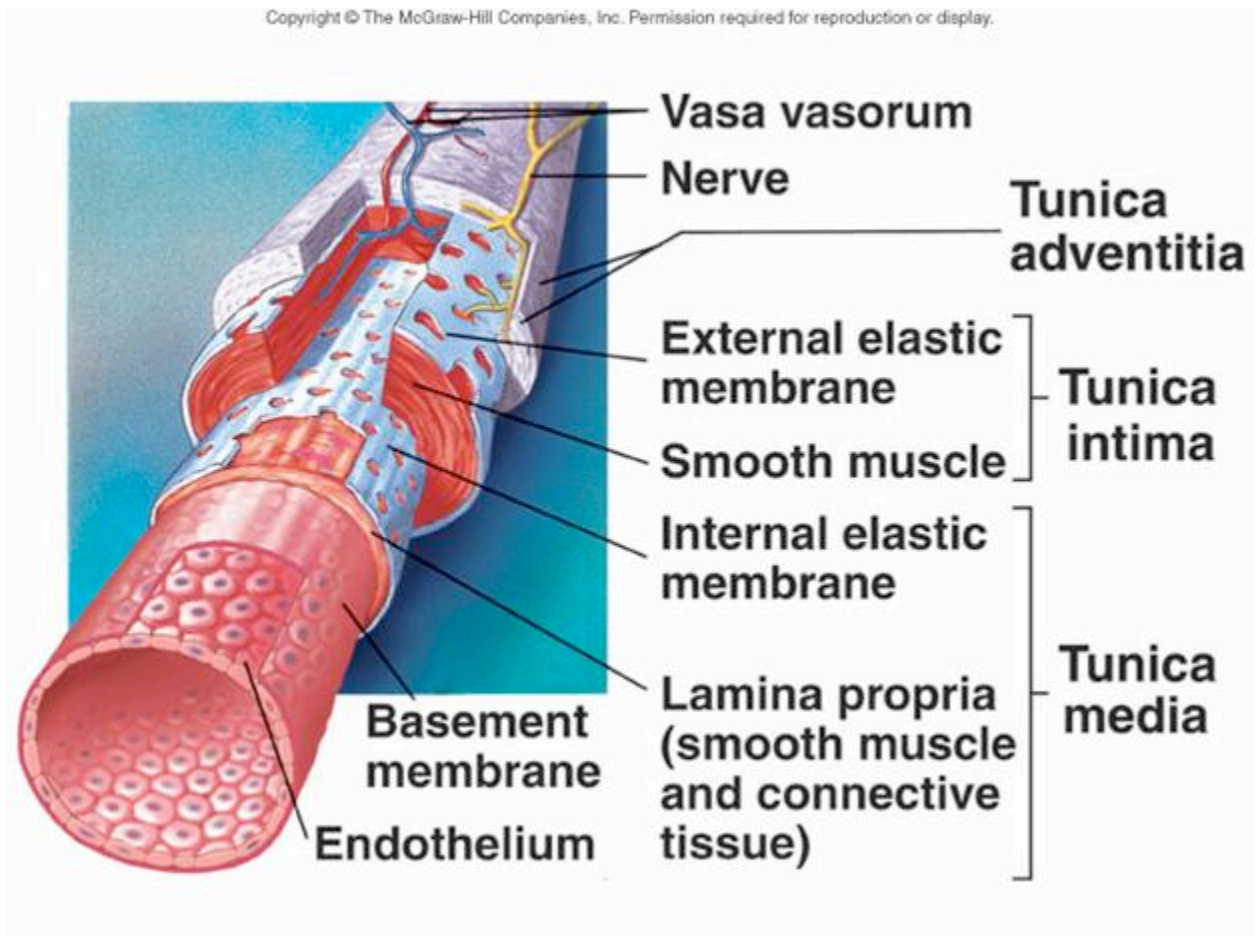


Figure 1- 1 Structure d'un vaisseau sanguin

1. L'endothélium

Considéré auparavant comme une simple couche inerte et non thrombogène tapissant la lumière des vaisseaux sanguins, l'endothélium est défini depuis 1970 comme un système en soit ayant des fonctions protectrices et sécrétrices (1). En effet, l'endothélium contrôle le tonus vaso-moteur en synthétisant et sécrétant une panoplie de molécules énumérées à titre indicatif dans le tableau 1-1 ci-dessous (2-5).

Tableau 1- 1 Agents actifs sécrétés par les cellules endothéliales.

Facteurs endothéliaux de relaxation	Facteurs endothéliaux de contraction
Oxyde Nitrique (NO)	Angiotensine II (Ang-II)
Prostacycline	Radicaux libres
Bradykinine	Thromboxane
Peptide natriurétique	Prostaglandine

L'endothélium est donc un organe à fonction endocrine qui régule le tonus vasomoteur et le transport moléculaire et cellulaire à cause de sa position anatomique à l'interface entre les compartiments sanguins et tissulaires. Il joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie. En condition physiologique normale, il agit telle une barrière sélective et perméable entre les deux compartiments, détecte et intègre des stimuli hémodynamiques et hormonaux et contribue, en fonction de ces signaux, aux échanges complexes entre le milieu intra-vasculaire, interstitiel et intra-cellulaire.

L'état de contraction et de relaxation des CML vasculaires est responsable du tonus vasomoteur général définissant le niveau de pression artérielle locale, répartissant le flux en fonction des besoins métaboliques. La balance des effets des agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs libérés par les CE dicte le tonus vasculaire en agissant sur les CML.

La fonction sécrétrice de l'endothélium fut décrite pour la première fois par Furchgott et Zawadzki (5) après la découverte du mode d'action vasorelaxant de l'acétylcholine. En effet, cet effet passe par la libération du monoxyde d'azote (NO, *Nitric Oxide*) par l'endothélium (Figure 1-2). Le NO est formé à partir de la L-arginine par une réaction catalysée par une enzyme, la NO synthase (NOS, *Nitric-Oxide Synthase*). Cette enzyme est exprimée de façon constitutive dans les CE (eNOS, *Endothelial NOS*). L'activation de cette enzyme dépend de la concentration intracellulaire du calcium libre (Ca^{2+}) dans le cytoplasme des cellules et des phosphorylations intracellulaires assurées par les protéines kinases A et B (aussi appelée Akt) (6). Les vasodilatateurs classiques comme l'acétylcholine, la bradykinine et autres, stimulent l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les CE. Le Ca^{2+} forme un complexe avec la calmoduline qui active ainsi la eNOS (3; 4). C'est ainsi que les CE, via le système nerveux sympathique, régulent la pression artérielle par l'action relaxante du NO sur les CML.

D'autres voies d'activation de la eNOS existent. L'insuline, par exemple, active la eNOS via la phosphorylation de l'Akt, qui à son tour phosphoryle la eNOS (cf. chapitre 2.1.2 sur l'insuline). Les formes neuronales (nNOS, *neuronal NOS*) et inductibles (iNOS, *inducible NOS*) de la NOS ne peuvent pas être activées par l'Akt (4). L'activation de la eNOS par les forces de cisaillement au niveau de l'endothélium passe aussi par l'action de l'Akt (7). Le NO ainsi formé diffuse dans les CML pour stimuler la guanylate cyclase soluble, ce qui entraîne la production de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) (Figure 1-2). Cette hausse du taux de GMPc entraîne au niveau des CML, une activation des protéines kinases G-1 qui phosphorylent d'une part la phospholambane et d'autre part, les phosphatases des chaînes légères de myosine. Alors que la phospholambane va favoriser la capture du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, les phosphatases des chaînes légères de myosine vont déphosphoryler les chaînes légères de myosine. Ces deux processus jumelés entraînent la relaxation des CML (8).

Les CE ne libèrent pas le NO uniquement vers les CML vasculaires sous-jacentes, mais également dans la lumière des vaisseaux sanguins. C'est ainsi que le NO inhibe l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur l'endothélium ainsi que l'agrégation plaquettaire (9-11). Le NO exerce aussi à la fois une action mitogénique sur les CE dans le processus de réparation vasculaire et inhibitrice de la prolifération sur les CML pour empêcher l'épaississement de la paroi vasculaire et la diminution de son élasticité. Le NO peut également interagir avec les espèces réactives d'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) qui endommagent l'endothélium pour diminuer leur impact (12; 13).

D'autre part, la relaxation des CML est aussi obtenue lors de l'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui est produite de la même façon et agit comme vasodilatateur de la même manière que le GMPc. La production de l'AMPc est

médiée entre autres par la prostacycline, vasodilatateur de la famille des eïcosanoïdes produit en réponse aux contraintes de cisaillement par les CE par l'action de l'enzyme prostacycline synthétase sur la prostaglandine (11; 14). D'autres facteurs, comme l'adrénaline, la noradrénaline ou l'ANF agissent comme vasodilatateur en augmentant la production de l'AMPc (15).

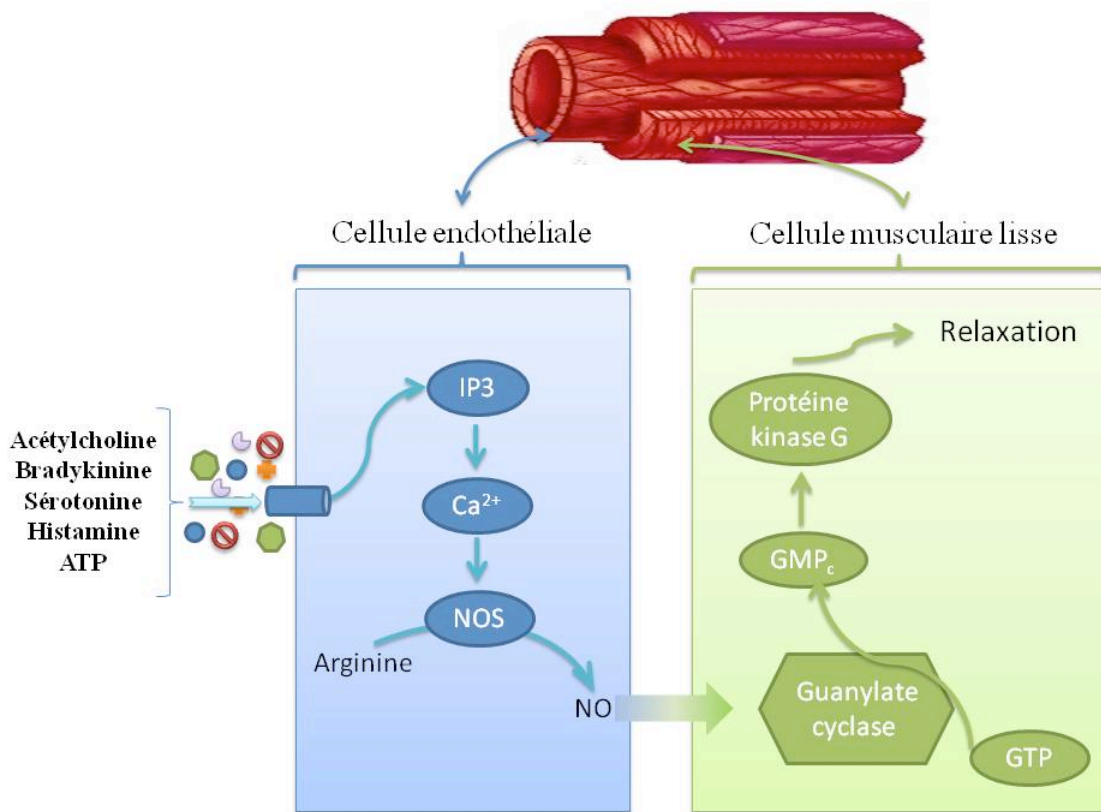


Figure 1- 2 Cycle de production du NO et de son action sur les cellules musculaires lisses

En outre, les CE sécrètent l'endothéline-1 (ET-1) dont la production est stimulée par la thrombine (16), le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (TGF $\beta 1$, *Transforming Growth Factor beta 1*), l'interleukine 1 (IL-1), l'épinéphrine et l'angiotensine II (Ang II), et est inhibée entre autre par le NO (17; 18). L'ET-1 induit la dilatation des artères à faible concentration par son action sur les récepteurs ET-B des CE dans lesquelles elle induit la sécrétion du NO et de la prostacycline. Toutefois, à fortes concentrations, c'est l'effet inverse qu'exerce l'ET-1 en agissant sur les récepteurs ET-A (19; 20). À l'état physiologique, les concentrations plasmatiques circulantes d'ET-1 sont faibles dû probablement à un rétro-contrôle négatif induit par le NO ou par une action paracrine (21).

L'endothélium peut aussi exprimer, dans certaines conditions physiopathologiques, des molécules d'adhésion qui conditionnent l'adhésion puis le

passage des leucocytes dans l'intima. D'une manière générale, l'endothélium joue un rôle déterminant au cours des processus inflammatoires.

L'endothélium est donc maintenant perçu comme un véritable organe endocrinien qui intervient directement dans la régulation de plusieurs processus biologiques, lesquels ont un impact certain sur la structure et l'activité vasculaire et, par conséquent, sur la santé vasculaire.

2. Les cellules musculaires lisses vasculaires

Les médiateurs de la capacité contractile de la paroi vasculaire sont les cellules musculaires lisses vasculaires localisées dans la média. Ce sont des cellules issues du mésoderme de forme allongée et fusiforme, qui possèdent un seul noyau cellulaire à l'inverse des autres types de cellules musculaires (22). La principale fonction des CML est de réguler le tonus vasculaire. Les CML de la média sont organisées en feuillets parallèles. Cependant, elles ne forment pas un tapis cellulaire homogène mais plutôt une suite anatomique de cellules présentant des états de différenciation plus ou moins avancés selon leur disposition dans l'artère (23; 24). La différenciation des CML est influencée par les CE et les cellules périvasculaires via des facteurs qu'elles sécrètent comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-B, *Platelet Derived Growth Factor beta*), le facteur de croissance fibroblastique (bFGF, *basic Fibroblast Growth Factor*), le facteur de croissance transformant (TGF β) et l'angiopoïétine-2 (25; 26).

Associées entre elles par une charpente de tissu conjonctif composée de collagène et d'élastine, la structure des CML ne présente pas de stries Z, à la différence des cellules du muscle strié d'où leur dénomination de lisses (23). Elles expriment des protéines spécifiques indispensables à la structure de leur cytosquelette et à leur fonction contractile comme l' α -actine, l' α -tropomyosine spécifiques du muscle lisse, la h-caldesmonine, la calponine et la protéine SM-22 α (27). Au fur et à mesure de leur maturation, le cytosquelette des CML se rigidifie et diminue ainsi leur capacité migratoire et proliférative (22) d'où l'hétérogénéité cellulaire retrouvée dans la média qui présente au moins deux phénotypes de CML caractérisées par leur forme, leur physiologie et leur capacité contractile migratoire et proliférative (28). C'est ainsi que nous pouvons distinguer dans les CML un phénotype contractile caractérisé par des cellules fusiformes à capacité proliférative et migratoire et un phénotype synthétique caractérisé par une morphologie polygonale presque inerte (29; 30).

La contraction des CML est calcium-dépendante ce qui induit la phosphorylation des chaînes de myosine. Pour cela, ces cellules expriment des récepteurs pour des ligands (acétylcholine, adrénaline, etc.) qui entraînent l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. La

réduction du taux cytoplasmique du Ca^{2+} entraînant une relaxation des CML peut être induite par différents facteurs comme le facteur natriurétique auriculaire (ANF, *Atrial Natriuretic Factor*) et le NO, qui stimule la capture par le réticulum sarcoplasmique du Ca^{2+} par la voie du GMPc (23).

Les CML ont un rôle essentiel à jouer dans le système vasculaire de l'organisme en régulant par leur contraction et leur relaxation le flux sanguin, la pression artérielle systémique et la distribution générale des nutriments et de l' O_2 jouant ainsi un rôle primordial dans l'homéostasie, la thermorégulation et la limitation de fuites sanguines en cas de blessures.

3. La matrice extracellulaire des artères

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure de soutien de la paroi vasculaire ce qui lui confère des propriétés mécaniques et biologiques essentielles au bon fonctionnement des artères. La MEC est composée de fibres de collagènes, de fibres élastiques, de glycoprotéines de structure et de protéoglycanes qui rendent les artères élastiques, résistantes à l'étirement et régulent ainsi leur contractilité. La quantité et la structure de chacun des composants de la MEC varient selon la grosseur et la fonction du vaisseau et sont modulées avec la maturation de l'organisme ou l'évolution d'une pathologie vasculaire (31).

Deux structures lamellaires, l'une interne et l'autre externe, séparent les 3 tuniques des vaisseaux : l'intima, la média et l'adventice. Entre elles s'intercalent des CML qui se lient à la MEC via la fibronectine et aux fibres de collagènes via la laminine. Ces interactions des CML maintiennent leur phénotype contractile (31). Dans l'adventice, du fait de leur fonction de structure, ce sont des fibres de collagène fibrillaire au diamètre plus grand et des fibroblastes qui prédominent en comparaison avec leur homologue de la média (31).

B. Pathogénèse de l'athérosclérose

L'athérosclérose n'est pas une maladie des temps modernes; elle a été identifiée dans les corps momifiés des pharaons par Sir Marc Amand Ruffer en 1911 (32). La première description complète de cette pathologie fut donnée pour la première fois en 1804. Elle était alors perçue comme une atteinte de la couche interne des artères qui se gorge de matière sébacée (33). De nos jours, c'est plutôt une dégénérescence de la tunique interne des artères caractérisée par l'épaississement et le raffermissement de ses parois que l'on nomme athérosclérose (du Grec *athéro* = mucus, colle et *skléros* = dur).

Selon la définition de l'OMS, ce remodelage de l'intima est accompagné d'une transformation de la média (34). La naissance de la lésion athérosclérotique commence par une strie lipidique riche en macrophages engorgés de lipides (35). Par la suite, des dépôts de cholestérol, de débris cellulaires, de calcium et d'autres substances s'accumulent dans la doublure intérieure de l'artère pour former ainsi la plaque. La formation des stries lipidiques peut commencer dès le développement fœtal et est fréquent durant l'enfance (36; 37). Mais tout d'abord, voyons de plus près la structure des vaisseaux sanguins et leur fonction pour mieux comprendre le processus d'athérogénèse.

1. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale était initialement définie comme une perte de la capacité d'un vaisseau à se dilater suite à un stimulus vasorelaxant, comme l'acétylcholine ou la bradykinine. Une compréhension plus approfondie de ce processus inclut maintenant un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique.

En effet, les facteurs de risque cardio-vasculaires (âge, tabac, diabète, etc.) inhibent le rôle protecteur de l'endothélium et augmentent la production de médiateurs vasoconstricteurs, pro-agrégants et pro-mitogènes (38). Une première étape dans l'athérogénèse et l'inflammation vasculaire est l'activation des CE qui augmente l'expression de molécules d'adhésion à leur surface (Figure 1-3) (39). Ceci a pour effet d'augmenter la probabilité de recrutement des leucocytes à la surface endothéliale. Les sélectines, les intégrines, la superfamille des immunoglobulines et les cadhérines constituent les quatre familles de molécules d'adhésion de la surface des CE. Parmi elles, la molécule d'adhésion de cellule vasculaire (VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule*), la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1, *Inter-Cellular Adhesion Molecule*) et la sélectine E permettent les différentes étapes de la diapédèse leucocytaire, à savoir, le roulement, l'adhérence ferme et la migration trans-endothéliale (40). L'adhésion des monocytes à la paroi du vaisseau et leur différenciation en macrophages qui s'accumulent dans la paroi vasculaire participent aux processus de développement des cellules spumeuses dérivées des macrophages dans ces parois (Figure 1-3).

Les facteurs environnementaux (stress, alimentation, tabagisme, etc.) et physiopathologiques (diabète, hypercholestérolémie, hypertension, etc.) qui stimulent ou favorisent la liaison des monocytes à la surface des cellules endothéliales jouent un rôle essentiel dans l'initiation du processus d'athérogénèse et de l'inflammation vasculaire qui mène à l'athérosclérose.

Une réduction de la biodisponibilité du NO dans la paroi vasculaire, par une inhibition de sa synthèse ou une augmentation de sa dégradation, a été un des premiers

facteurs rapportés dans la dysfonction endothéliale. En effet, un vaisseau dont l'endothélium sécrète moins de NO présente une fonction vasomotrice altérée et un processus d'athérogénèse débuté. De plus, une baisse de l'activité du NO issu de l'endothélium contribue à l'augmentation de l'agrégation plaquettaire, de la prolifération des CML et à la stimulation des interactions endothélium-leucocytes (41; 42).

La dysfonction endothéliale est, de ce fait, un élément clé de l'initiation des premières étapes du développement de l'athérosclérose. La diminution de la biodisponibilité du NO peut être due à une inhibition de l'activité de la eNOS par des agents exogènes et/ou endogènes, ou par un manque de son substrat principal, la L-arginine. Par ailleurs, des produits oxydants comme l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl (HO^\bullet), l'acide hypochlorique (HOCl) et les radicaux lipidiques produits par le métabolisme anaérobie (43), sont connus pour leur capacité à inhiber le NO. Ces produits hautement réactifs appelés les espèces réactives de l'oxygène, ROS, lient le NO pour former le peroxynitrite, un oxydant très puissant (38; 44). Le peroxynitrite est un catalyseur de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL, *Low Density Lipoprotein*) augmentant ainsi leur potentiel pro-athérogénique (45). De plus, le peroxynitrite entraîne la dégradation du BH_4 (tétrahydrobioptérine) un important cofacteur de la eNOS (46), ce qui a pour effet de découpler cette protéine et d'augmenter la production de ROS (47). Le découplage de la eNOS a pour résultat de libérer deux dimères bioactifs à activité réductase. Ceci entraîne la formation de plus de ROS ce qui aggrave la dysfonction endothéliale (48). L'excès de signaux oxydatifs mène à un état pro-inflammatoire des vaisseaux. Les ROS induisent l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et chémoattractantes (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) à la surface endothéliale (45).

D'autres facteurs peuvent diminuer la biodisponibilité du NO au niveau vasculaire en altérant l'activité de la eNOS. La protéine C réactive (CRP, *C-Reactive Protein*), par exemple, est connue pour son activité inhibitrice de la eNOS (49; 50). La NADPH oxydase (51; 52), la xanthine oxydase (53) et les mitochondries (54), quant à elles, influencent indirectement l'activité eNOS en augmentant la production de ROS. Plus récemment, un nouveau facteur de réduction de la production de NO a été découvert : la diméthylarginine. En effet, la eNOS utilise la L-arginine pour produire le NO. La présence de cette arginine asymétrique inhibe la fonction de eNOS. La concentration de la diméthylarginine dans le plasma est directement associée à la dysfonction endothéliale, à l'épaississement de l'intima artérielle, l'athérosclérose et l'hypertrophie ventriculaire gauche, et est inversement proportionnelle à la relaxation vasculaire (54-57).

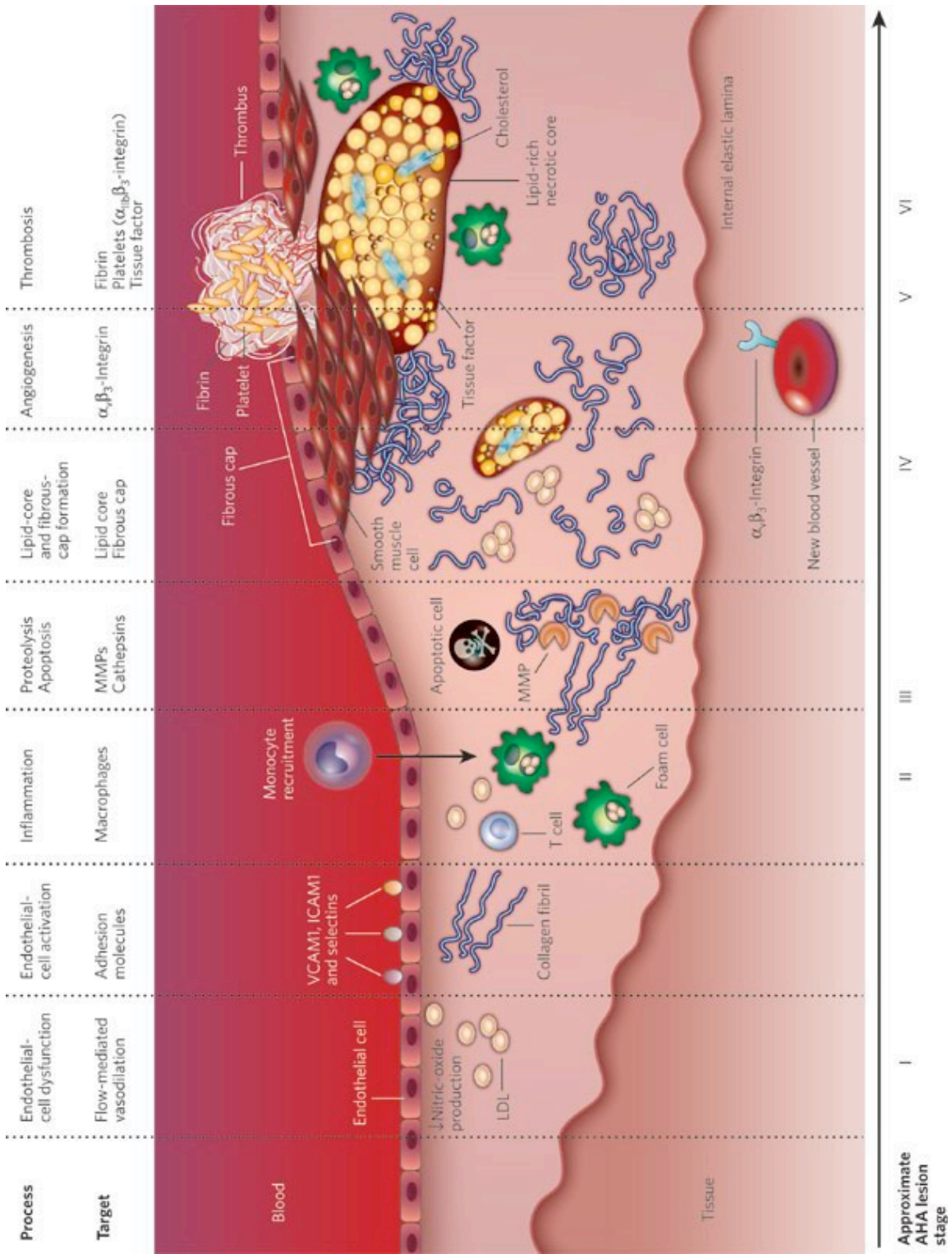


Figure 1- 3 Développement de la lésion athérosclérotique (58).

L'Ang II exerce aussi une action dans ce processus. En effet, il a été bien démontré qu'une perfusion d'Ang II induit une dysfonction endothéliale chez des rats sains (59-61), augmente la production de ROS via la stimulation du NADPH oxydase (52) et promeut l'inflammation vasculaire (62). Chez les patients hypertendus, le blocage de la voie rénine-angiotensine, par l'utilisation de bloqueurs de l'enzyme de conversion, améliore la fonction endothéliale (63).

La sécrétion des agents favorisant la dysfonction endothéliale et inhibant la protection vasculaire est reliée à diverses pathologies telles l'hypertension (63; 64), le diabète (65-68), les coronaropathies (69), les cardiomyopathies (53) et l'insuffisance rénale chronique (70). De plus, cette manifestation de la dysfonction endothéliale n'est pas seulement associée aux atteintes cardiovasculaires, mais peut se développer bien avant leur apparition (71) et ce, même chez des jeunes asymptomatiques présentant un haut risque de développer de l'athérosclérose (72). La dysfonction endothéliale est corrélée à la résistance à l'insuline (73), au syndrome métabolique et à la dyslipidémie (74), à l'obésité (75), à la sédentarité (76) et au tabagisme (77) en absence de maladies cardiovasculaires. Dans le cas du diabète de type 2 (DT2), alors que la voie des protéines-kinases activées en cascade (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinase*) n'est pas affectée, la voie de signalisation insulinique menant à la phosphorylation et l'activation de l'Akt est lourdement altérée (78-81). L'Akt est une protéine responsable de l'activation par phosphorylation de la eNOS. L'absence de son activité dans le DT2 est à l'origine de la dysfonction endothéliale. De plus, l'hyperglycémie chez les diabétiques augmente la glycation des protéines plasmatiques pour former ce qu'on appelle les produits glyqués à leur extrémité (AGE, *Advanced Glycation End products*). Les AGE se lient au NO et annulent son effet au niveau endothélial (82). De plus, les protéines glyquées induisent la formation de ROS et promeuvent l'inflammation vasculaire en augmentant l'expression de l'IL-6, VCAM-1 et MCP-1 (83). Finalement, l'hyperglycémie soutenue réduit la production du NO (84) et atténue la vasodilatation chez l'humain (85).

2. Les effets physiopathologiques de la dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est souvent présentée comme point de départ du processus physiopathologique menant à l'athérosclérose (72). C'est le point commun reliant différentes pathologies comme l'hypertension, l'insuffisance rénale, le diabète et les atteintes cardiovasculaires. La diminution de la biodisponibilité du NO au niveau vasculaire stimule l'expression de VCAM-1 à la surface des CE via l'induction de l'expression de NF- κ B (86). Les ROS, la CRP, le CD40 ligand et LOX-1 (*Lectin-like OXidized LDL receptor-1*) augmentent aussi l'expression des molécules d'adhésion endothéliales (87). L'expression de VCAM-1, ICAM-1 et de la E-sélectine à la surface

des CE joue un rôle initiateur du processus inflammatoire. VCAM-1 lie les monocytes et les lymphocytes T à la surface des CE (88). La réduction du NO conduit également à l'augmentation de l'expression de MCP-1 ce qui permet le recrutement des cellules phagocytaires mononucléées (89). Les macrophages, en se gorgeant de LDL oxydés (oxLDL, *oxidized LDL*) via le récepteur LOX-1, hautement exprimé dans les vaisseaux sanguins des hypertendus, des diabétiques et des dyslipidémiques, se transforment en cellules spumeuses (90). L'expression de LOX-1 peut aussi être stimulée par l'Ang II et l'ET-1 (91; 92).

3. La genèse de la plaque et sa rupture

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire de l'intima des grosses artères (35; 93). Comme cela est présenté dans la figure 1-3, la formation de la plaque d'athérosclérose mettant en jeu les macrophages, les CE, les CML et les lymphocytes, peut se résumer en trois temps évolutifs successifs : 1) la formation de la strie lipidique, 2) la lésion fibro-lipidique et 3) la plaque complexe.

La formation de la plaque athérosclérotique commence par l'accumulation des LDL, qui sont des lipoprotéines athérogènes, dans l'intima. C'est un phénomène passif résultant d'un déséquilibre entre leurs flux d'entrée et de sortie, étroitement liés à leur concentration plasmatique, qui constitue un risque cardiovasculaire menant à une athérosclérose précoce (94-97). Des facteurs hémodynamiques (pression, forces de cisaillement etc.) influencent aussi le transfert des LDL à travers l'intima où ils seront oxydés (38; 94; 97; 98). Ces particules lipidiques, constituées majoritairement du cholestérol et d'apolipoprotéine B100 (Apo-B100), favorisent le processus d'athérosclérose durant toutes ses étapes : l'initiation, la progression et la rupture (88; 94-96; 99-101). Comme cela a été présenté précédemment, l'accumulation des LDL dans l'espace sous endothélial, conduit à la dysfonction endothéliale. Ce phénomène provoque l'expression à la surface endothéliale des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 ce qui déclenche le recrutement et l'infiltration des monocytes circulants dans l'intima. Les monocytes traversent l'intima, se transforment en macrophages puis en cellules spumeuses suite à l'accumulation d'oxLDL, conduisant ainsi à la formation de stries lipidiques à la surface luminale (35; 96; 97; 99-101). Des facteurs comme le MCP-1, nécessaire au passage des monocytes à travers la paroi endothéliale (102; 103), et le facteur de stimulation des monocytes (M-CSF, *Monocyte-Colony Stimulating Factor*) stimulant la différenciation et la prolifération des monocytes en macrophages, jouent un rôle essentiel dans ce processus (104; 105).

Les macrophages infiltrés dans la paroi sous endothéliale captent et internalisent de grandes quantités d'oxLDL via des récepteurs « scavengers » ou éboueurs (CD36,

CD68, SR-AI, SR-AII) (106). L'accumulation excessive d'oxLDL altère la fonction et le phénotype des macrophages qui se gorgent de lipides et se transforment ainsi en cellules spumeuses. Par la suite, une réaction inflammatoire chronique s'instaure via les macrophages et les lymphocytes infiltrés dans la paroi intimale. Des médiateurs solubles, des cytokines leucocytaires et vasculaires ainsi que des molécules immunorégulatrices membranaires telles CD40/CD40L sont directement impliqués dans ce processus (107). Un grand nombre de cytokines sont présentes dans la plaque d'athérosclérose : le facteur nécrosant des tumeurs (TNF α , *Tumor Necrosis Factor-alpha*), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 et l'interféron gamma (IFN- γ). Ces cytokines jouent un rôle dans le recrutement des monocytes via la sécrétion de chimiokines (MCP-1 et IL-8) par les cellules de la plaque, et favorisent leur adhésion à l'endothélium par l'induction de l'expression des molécules d'adhésion par les CE (108). Au fur et à mesure de la progression de l'athérosclérose, les facteurs de croissance sécrétés par les macrophages dans la plaque stimulent la croissance des CML vasculaires et la synthèse de collagène interstitiel. La réduction de la production de NO et l'augmentation de celle de ROS et des cytokines activent les protéines de matrice à activité métallo protéinases (MMP, *Matrix Metallo-Proteinase*) (109), plus spécifiquement les MMP-2 et MMP-9. Ces dernières affaiblissent le cap fibreux de la plaque athérosclérotique en dégradant les fibres de collagène et d'élastine et provoquent ainsi son amincissement (110). La rupture de la plaque met des substances thrombogènes en contact avec le sang et provoque ainsi une obstruction thrombotique du vaisseau pouvant mener à l'accident vasculaire cérébral (AVC), l'infarctus du myocarde et autres atteintes liées à l'obstruction des vaisseaux sanguins.

Les MMP, produites par une variété de cellules telles les CE, les CML et les monocytes, forment une famille de protéases classées en sous groupes, incluant les collagénases (MMP-1, -8, -13 et -18), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, -10, -11) et les MMP membranaires (MT-MMP, *Membrane Type MMP*). L'activité protéolytique des MMP est régulée par des facteurs intracellulaires et extracellulaires. Les facteurs de croissances, les cytokines, les hormones ainsi que les promoteurs tumoraux régulent l'expression des MMP au niveau transcriptionnel. L'expression des MMP peut aussi être induite par les oxLDL du noyau lipidique de la plaque, les ROS, la plasmine et la thrombine. Les oxLDL contribuent à la fragilisation des plaques en inhibant l'expression de l'inhibiteur des MMP (TIMP-1, *Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases*) exprimés par les macrophages et en induisant l'apoptose des CML.

Dans une plaque affaiblie, le nombre de macrophages produisant des MMP est augmenté et le nombre de CML réparant la MEC est diminué. Les lymphocytes T activés détruisent les CML (110; 111) ce qui a pour conséquence de diminuer la synthèse du collagène I et III. Les lymphocytes T influencent aussi la dégradation de la MEC en

stimulant la production de MMP par les macrophages (112). Les neutrophiles, présents dans la circulation et la plaque, sécrètent du MMP-8 et contribuent activement au processus inflammatoire (113). Finalement, la production des collagènes de type I et III par les CML, essentielle au maintien de l'intégrité de la matrice vasculaire, est fortement inhibée par l'IFN- γ . De plus, l'IL-1 et le TNF- α stimulent l'activité de la MMP-1, la MMP-2, MMP-9 et MMP-13 par les CML (110) qui dégradent les protéoglycanes et l'élastine de la matrice vasculaire (109). Le déséquilibre entre la dégradation et la réparation de la MEC est la base du processus menant à la rupture de la plaque.

Un autre phénomène qui contribue à la déstabilisation de la plaque est l'apoptose de divers types cellulaires incluant les macrophages, les lymphocytes T, les CE et les CML (114). Les macrophages apoptotiques sont plus abondants dans les plaques vulnérables comparativement aux plaques stables (115). La réaction inflammatoire détermine le taux de cellules apoptotiques. Les cytokines induisent par exemple, une surproduction de NO qui se transforme en peroxy-nitrite, un agent apoptotique (116-118). L'apoptose joue un rôle déterminant dans la formation de la plaque d'athérosclérose (119). L'une des avancées majeures des années 1990 fut la démonstration que les manifestations cliniques graves de l'athérosclérose ne sont pas tant reliées à la taille des plaques que causées par l'inflammation, l'instabilité des plaques et le taux de cellules apoptotiques.

4. Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires

L'accumulation de lipides dans les CML est une caractéristique de la plaque athérosclérotique. En effet, une plaque riche en lipides avec un noyau lipidique confiné dans le cap fibreux indique une phase avancée de l'athérogénèse. La stabilité de cette lésion dépend de l'abondance des CML et de leur capacité réparatrice dans le cap fibreux (120). Les cellules spumeuses dérivent en majorité de CML engorgées de lipides ; elles se retrouvent non seulement au début du processus athérogénique mais aussi dans la plaque athérosclérotique finale. L'engorgement en lipoprotéines des CML est bien établi (121; 122). Cependant, à la différence des macrophages, ces cellules n'ont pas besoin de récepteurs scavenger (122). De plus, elles ne surexpriment pas ces récepteurs dans la plaque athérosclérotique, et sont même résistantes à un apport lipidique *in vitro* en présence de fortes concentrations de LDL et d'oxLDL (123). Ceci indique que d'autres mécanismes entrent en action pour la transformation des CML en cellules spumeuses tels que, par exemple, l'accumulation des lipoprotéines de très basse densité (VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*) et du LDL, lente certes, mais s'opérant via leur récepteurs respectifs. Une autre possibilité est le passage passif des lipides en cas d'hyperlipidémie, tel qu'observé chez les diabétiques et les obèses. En outre, il a été démontré que des CML incubées avec de l'acétate radioactif ont la capacité de synthétiser des phospholipides et

des triglycérides (124). Une lipogenèse excessive pourrait conduire à la formation de cellules spumeuses. La lipogenèse est une caractéristique des adipocytes certes, mais les CML sont bien connues pour avoir des caractéristiques mésenchymateuses et démontrent une plasticité phénotypique dans des conditions physiopathologiques (125; 126). Donc, comme cela est observé dans les hépatocytes et les cellules β pancréatiques, qui accumulent du gras dans certaines conditions pathologiques, les CML aussi peuvent développer un phénotype adipocytaire lorsqu'exposées à des conditions adipogéniques (127). Ceci indique clairement que les cellules spumeuses des lésions athérosclérotiques ne sont pas toutes d'origine macrophagique même en présence de marqueur de macrophages dans leur structure. Également, les changements inflammatoires menant à la formation de cellules spumeuses ne sont pas simplement dus à une accumulation de cholestérol (127).

La prolifération des CML est aussi mise en cause dans la physiopathologie de l'athérosclérose en réponse à une lésion vasculaire (35). Quelques travaux (128-130) soutiennent l'hypothèse que, dans les premières semaines après que la lésion de l'artère soit survenue, les CML prolifèrent dans la média et migrent vers l'intima causant un épaississement de celle-ci. De plus, c'est à ce niveau qu'elles entrent en contact avec les d'acides gras (AG) sériques qui induisent leur apoptose et l'aggravation de la formation de la plaque (131). Les oxLDL produisent un effet chimiotactique, direct ou indirect sur les CML via les cytokines (35). En culture, ils démontrent un effet biphasique sur les CML; mitogènes à faibles doses et cytotoxiques à fortes doses (132). Le premier effet passe par l'activation des voies de signalisation mitogène des médiateurs sphingolipides qui activent la voie des MAPK (133; 134), et par l'activation des voies de survie médiées par le récepteur du facteur de croissance endothélial (EGFR, *Endothelial Growth Factor Receptor*) et la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (135). L'effet mitogène des oxLDL peut aussi être indirect par l'augmentation de l'expression de facteurs de croissance tels le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), le PDGF, le b FGF ou encore le M-CSF (35).

II. Le diabète

A. Concepts généraux du métabolisme

L'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) est la source universelle d'énergie. Cette énergie est générée par la dégradation de molécules organiques telles les lipides et les glucides qui demeurent les combustibles métaboliques les plus utilisés par les cellules de l'organisme.

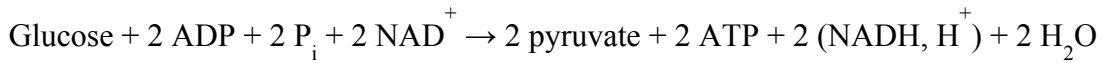
1. Le glucose

Toutes les cellules animales en général, et humaines plus spécifiquement, utilisent le glucose comme source primaire d'énergie. L'utilisation du glucose pour produire de l'énergie s'effectue en deux temps : la glycolyse suivie de la respiration au sein des mitochondries (Figure 2-1). La première étape consiste en la dégradation du glucose en pyruvate pour produire 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH (forme oxydé du coenzyme NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). Cette réaction fait intervenir divers enzymes comme le glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (G3PDH) souvent utilisés comme marqueur de l'activité énergétique des cellules adipeuses (136). Le pyruvate, oxydé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) au sein des mitochondries, sera ensuite dégradé lors du cycle de Krebs pour produire davantage d'ATP utilisable par la cellule. Le cycle de Krebs, qui est la voie de dégradation du pyruvate chez les organismes aérobies, produit une molécule d'ATP et 4 électrons de haute énergie qui seront transportés par 3 molécules de NADH et une molécule de FADH₂ (forme oxydé du coenzyme FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) par molécule de pyruvate (Figure 2-1).

Le NADH et FADH₂, issues du cycle de Krebs, atteindront la chaîne respiratoire des mitochondries pour produire de nouvelles molécules d'ATP. La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de quatre complexes protéiques enchâssés dans la bicouche lipidique de la membrane interne des mitochondries. Ces complexes protéiques recueillent l'énergie stockée dans le NADH et le FADH₂ sous forme d'électrons qui vont permettre d'instaurer un gradient de proton dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ce gradient protonique activera l'ATP synthase qui phosphorylera l'ADP pour produire l'ATP (Figure 2-1).

Le bilan de production d'ATP par molécule de glucose est alors 32 ATP :

✓ **Glycolyse**



✓ **Cycle de Krebs**

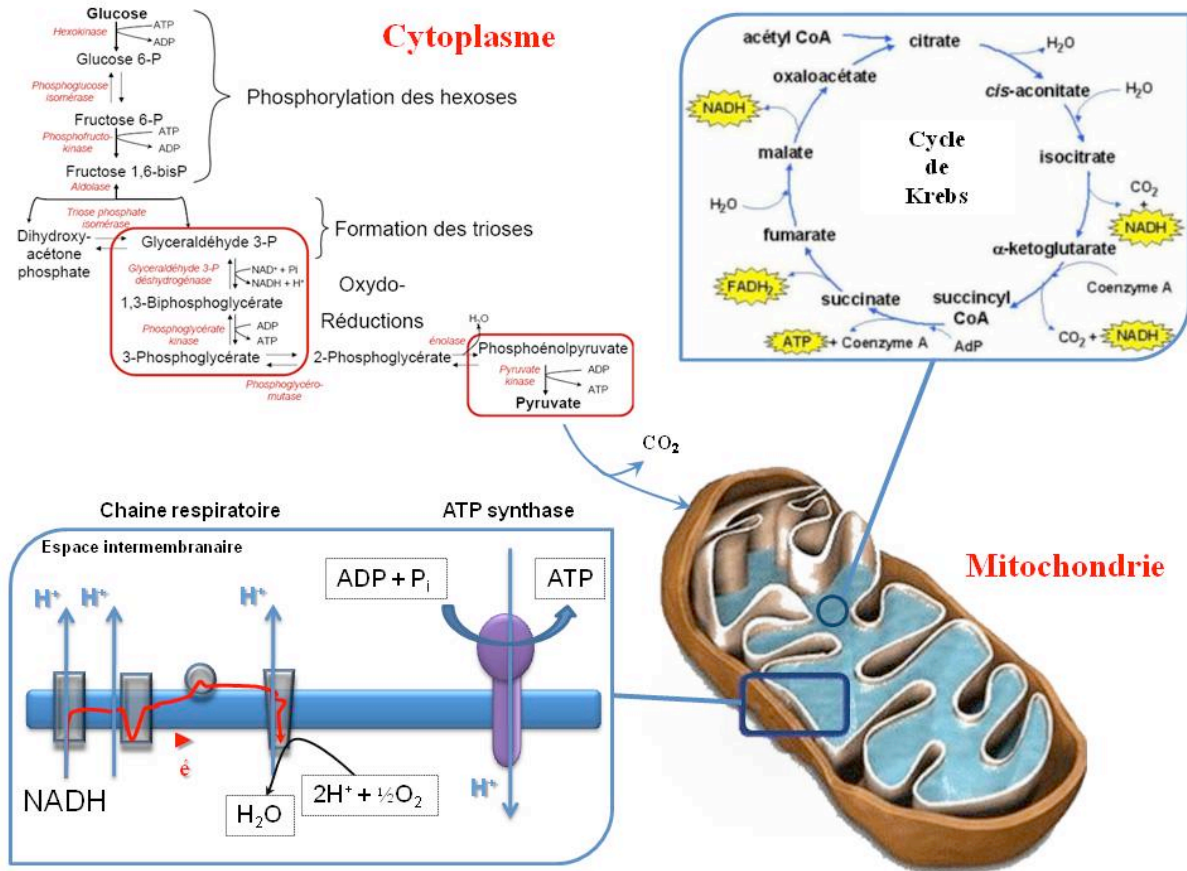
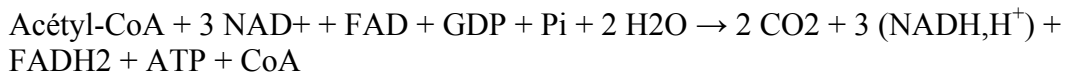


Figure 2- 1 Vue d'ensemble de la glycolyse

De même que la dégradation du glucose, la dégradation des lipides sous forme AG permet aux cellules d'obtenir l'énergie nécessaire à leur survie. Cette dégradation s'effectue dans la mitochondrie selon un ensemble de réactions de bêta-oxydation des AG. A chaque cycle β-oxidatif, l'AG forme une molécule d'acétyl-CoA qui sera utilisé par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie.

Durant un exercice, les lipides sont incapables seuls de subvenir aux besoins énergétiques de l'organisme ; la plus grande partie de la synthèse d'ATP provient alors de la transformation du glucose en CO_2 et H_2O en présence de quantité adéquate d' O_2 : c'est la glycolyse aérobie. Par contre, si l'apport d' O_2 est insuffisant comme dans le cas d'un effort intense durant lequel la quantité d' O_2 n'est pas proportionnelle à l'effort fourni, le pyruvate formé n'entre pas dans le cycle de Krebs mais est plutôt réduit en lactate. Ce processus de glycolyse anaérobie s'accompagne d'une production moindre d'ATP mais ne requiert pas la présence d' O_2 .

La β -oxydation des lipides en condition anaérobie déclenche une accumulation d'acétyl-CoA. Celui-ci, lorsqu'il est produit en excès, est converti en acéto-acétate, en béta-hydroxybutyrate et en acétone. La β -oxydation trop rapide d'une trop grande quantité d'AG produit une grande quantité d'acétyl-CoA. Ce dernier est prioritairement utilisé par le cycle de Krebs, mais, lorsqu'il sature, l'excédent subit la cétogenèse au niveau du foie c'est-à-dire la transformation en corps cétoniques. L'accumulation des corps cétoniques mène à l'acidocétose qui peut être fatale.

Les cellules de l'organisme ont un besoin permanent de glucides qui constituent pour elles la source principale d'énergie. Toutefois, la disponibilité du glucose dans le sang est intermittente pendant la journée durant les périodes postprandiales ou un jeûne prolongé. L'organisme doit donc impérativement constituer des réserves qui permettent de combler le manque de glucides en tout temps. Pour cette raison, lors d'un apport alimentaire, l'organisme conserve les glucides fournis par les nutriments sous forme de molécule polymérique : le glycogène. Cette molécule est synthétisée dans les cellules hépatiques et musculaires et renferme plus de 50,000 molécules de glucose (1). Seul le glycogène hépatique est ensuite redistribué dans l'organisme, au besoin, après sa dégradation dans les vésicules de stockage hépatocytaires.

La dégradation du glycogène est initiée par la glycogène-phosphorylase qui coupe la liaison α -1,4 de la macromolécule pour libérer une molécule de glucose. Cette étape, qui s'opère jusqu'au quatrième résidu glucose de la ramification α -1,6, libère du glucose-1-phosphate après la greffe d'un groupement phosphate sur le carbone 1 du glucose (Figure 2-2). La charpente restante résiste à l'action de la phosphorylase dont l'action est limitée par la présence de la longue ramification de glucose.

C'est ainsi que la glycosyl-4,4-transférase entre en action. Elle agit sur le produit de la première étape en coupant sur chaque la ramification α -1,6 de la charpente résiduelle une chaîne de 3 résidus glucose pour la greffer sur la ramification suivante. Par la suite, une α -glucosidase coupe la liaison α -1,6 pour libérer le glucose résiduel de la ramification. Ainsi, la phosphorylase peut reprendre son activité sur la charpente résiduelle et libérer d'autres molécules de glucose.

Le produit de ces diverses étapes est la libération en premier lieu du glucose-1-phosphate qui ne peut diffuser librement à l'extérieur des cellules contrairement au glucose qui lui est libéré en très faible quantité. Pour cela, ce premier produit est isomérisé en glucose-6-phosphate par l'action d'une phosphoglucomutase qui peut entrer dans le foie et le muscle où il sera glycolysé.

Le but de la dégradation du glycogène dans le foie est de maintenir une glycémie systémique constante, surtout en période de privation postprandiale. Le foie dispose de la glucose-6-phosphatase (G6Pase) qui va permettre au glucose de quitter cet organe et de maintenir une concentration constante de glucose dans le sang. L'enzyme est absente du cerveau et du muscle.

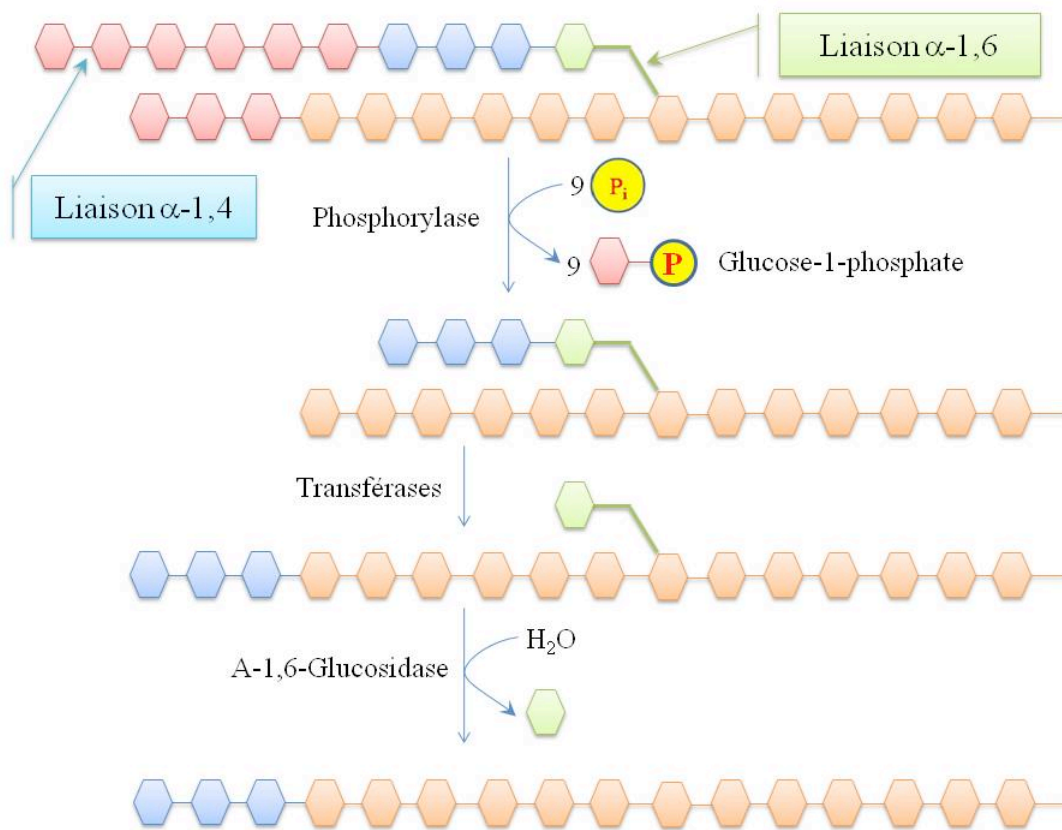


Figure 2- 2 Hydrolyse du glycogène

L'homéostasie du glucose est donc orchestrée par le foie qui est capable de changer rapidement son activité de captation du glucose suite à un repas par celle de production de glucose en état de jeûne. Les niveaux de glucose sanguin sont toutefois régulés par trois processus étroitement liés qui sont 1) la production hépatique de glucose

(gluconéogénèse), 2) son utilisation par les tissus périphériques et 3) la sécrétion d'insuline par le pancréas. La production d'énergie par les cellules de l'organisme est limitée par l'entrée du glucose dans leur cytoplasme. L'entrée du glucose dans la majorité des tissus s'effectue par diffusion facilitée et est proportionnelle à la glycémie systémique. L'action de l'insuline augmente par ailleurs le transport de glucose, contre le gradient de concentration, dans les tissus musculaires, adipeux et hépatiques; tissus de stockage énergétique du surplus de glucose.

2. L'insuline

En 1868, un biologiste allemand, dénommé Paul Langerhans, décrit pour la première fois des îlots de cellules qui semblent sécréter une hormone au niveau du pancréas. Ce n'est qu'en 1921 qu'un groupe de chercheurs de l'université de Toronto a pu isoler la protéine sécrétée par ces îlots pancréatiques qui a pour caractéristique de réduire la glycémie chez des diabétiques : l'insuline (137; 138). La séquence primaire de cette hormone fut découverte en 1955 par l'équipe britannique du Dr Frederick Sanger pour devenir par la suite la première protéine synthétisée chimiquement (139). L'insuline est aussi la première protéine à avoir été bio-synthétisée dans un microorganisme par la technologie de l'ADN recombinant. Cela a permis de créer des analogues optimaux du point de vue de la pharmacodynamie et de la biodisponibilité de l'insuline dans le traitement du diabète. Depuis les années '80, l'insuline est produite par génie génétique (140). Sans insuline, l'organisme ne peut utiliser sa source d'énergie : le glucose (Figure 2-3).

a) La structure et les rôles de l'insuline

L'insuline est une hormone anabolique qui agit principalement au niveau hépatique, adipocytaire et musculaire. Il s'agit d'un polypeptide de 51 acides aminés d'environ 6 kDa, composé de deux chaînes reliées entre elles par deux ponts disulfures, produit et sécrété par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Figure 2-3). Elle est synthétisée sous forme de pro-insuline et transportée à l'intérieur de microvésicules jusqu'à l'appareil de Golgi des cellules β où les granules de sécrétion sont formés. Le clivage de la pro-insuline en insuline se fait juste avant sa sécrétion par des enzymes spécifiques contenues dans les granules de sécrétion qui se forment à la sortie de l'appareil de Golgi. La sécrétion d'insuline est stimulée par une augmentation de la glycémie, des acides aminés et des AG dans la circulation sanguine. Certaines hormones à action hyperglycémiantes, comme le glucagon, l'adrénaline, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes, réduisent la libération d'insuline.

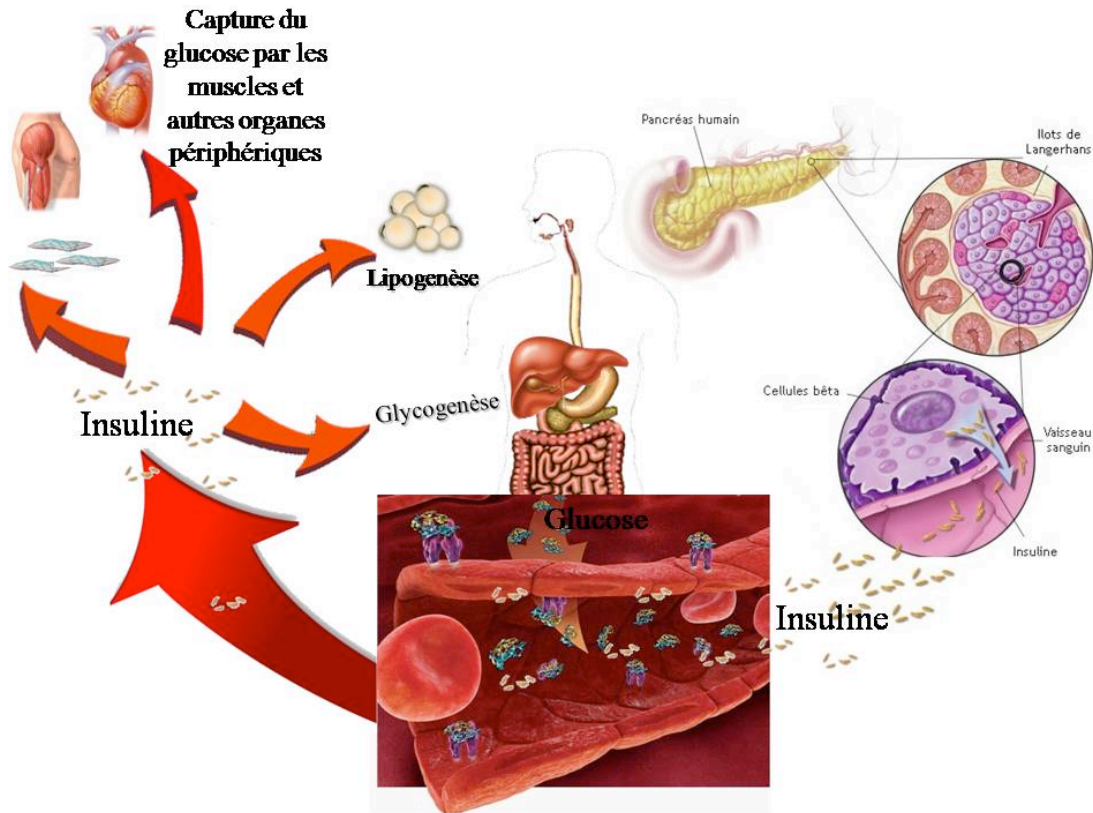


Figure 2- 3 Principales étapes de la sécrétion et de l'action de l'insuline.

En plus de son contrôle sur le métabolisme glucidique, l'insuline gouverne les processus de transport, d'utilisation et d'entreposage du glucose, des AG et des acides aminés (Figure 2-3). Par ailleurs, l'insuline possède des effets inhibiteurs sur la gluconéogenèse, la glycogénolyse, la lipolyse et le catabolisme des protéines. Ses actions sont principalement exercées au niveau des muscles squelettiques, du tissu adipeux et du foie. L'insuline exerce aussi des fonctions pléiotropes (pouvant agir sur plusieurs cibles et produisant des effets indépendants les uns des autres) sur la croissance, le développement et la mort cellulaire ainsi que sur le métabolisme des protéines en augmentant leur synthèse et en inhibant la protéolyse. De plus, chez l'humain, l'insuline augmente l'activité du système nerveux sympathique causant une augmentation de la relâche de catécholamines comme la norépinephrine. L'augmentation de l'action vasoconstrictrice du système sympathique combinée à la réduction de la résistance vasculaire dans les muscles squelettiques expliquerait le fait qu'il n'y a pas de changement dans la pression artérielle moyenne en période postprandiale (141). L'une des actions cardiovasculaires les plus importantes de l'insuline est son effet stimulateur de la production de NO par les CE vasculaires (142). En effet, du fait de son action hypoglycémiante, il a été démontré que l'insuline augmente le débit sanguin dans les tissus périphériques essentiellement par un

effet de vasodilatation des vaisseaux sanguins, surtout périphériques (143). L'action vasorelaxante de l'insuline est due essentiellement à l'activation de la eNOS des CE. Cette activation passe par une voie de signalisation indépendante du Ca^{2+} , à l'inverse de l'acétylcholine qui utilise des récepteurs couplés aux protéines G pour agir sur le niveau calcique stimulateur des eNOS (144-147). L'énigme de la voie de signalisation liant l'activation du récepteur à l'insuline (IR, *Insulin Receptor*) jusqu'à l'activation des eNOS fut résolue récemment. Après la liaison de l'insuline, la tyrosine kinase de l'IR est activée pour phosphoryler son substrat (IRS-1, *Insulin Receptor Substrate-1*). Cette étape permet la liaison de l'IRS-1 à la PI3K qui est activée et active subséquemment la kinase déshydrogénase du pyruvate (PDK-1, *PI3K Dependent Kinase-1*) (Figure 2-4). C'est ainsi que ce dernier active l'Akt qui phosphoryle et active l'eNOS menant à la production de NO en quelques minutes (79; 142; 145; 148).

b) Le récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline est une protéine tétramérique constitué de deux sous-unités α à la surface de la membrane cellulaire et de deux sous-unités β transmembranaires à activité tyrosine kinase (149). Il appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire (RTKs, *Receptor Tyrosine Kinases*). Cette famille inclut aussi l'IGF-1R (*Insulin Growth Factor-1 Receptor*), un récepteur orphelin activé par l'insuline et l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) (150). Les sous-unités β confèrent à l'IR la fonction de facteur de croissance en plus de sa fonction métabolique (151).

Le côté C-terminal des sous-unités α de l'IR possède un site de liaison de l'insuline qui correspond au site de fixation de l'IGF-1 (151). Chaque sous-unité α , présente de part et d'autre de la membrane cytoplasmique une séquence protéique riche en cystéines qui permet la formation de ponts disulfures entre les deux sous-unités α et également entre les sous-unités α et β . Le récepteur à l'insuline fonctionne comme une enzyme allostérique avec une fonction inhibitrice en absence de ligand exercée par la sous-unité α sur l'activité phosphorylante de la sous unité β en maintenant son site tyrosine kinase dans une boucle protéique inaccessible. La fixation de l'insuline sur la chaîne α de l'IR induit un changement conformationnel de celles-ci, ce qui permet la levée de l'inhibition de l'activité kinase des sous-unités β . Le récepteur à l'insuline est surtout exprimé dans les cellules du tissu adipeux, les cellules musculaires et dans le foie (152).

Certaines mutations du domaine de liaison de la sous-unité α peuvent être responsables d'une affinité réduite du ligand à son récepteur. D'autres mutations peuvent aboutir à un fonctionnement aberrant du récepteur ou à un déficit de son recyclage dans la cellule, le tout aboutissant à une résistance à l'insuline.

c) La cascade d'activation de l'insuline

La liaison de l'insuline à son récepteur initie le changement de conformation de la sous-unité α et le redéploiement de la boucle protéique qu'elle maintient autour du site tyrosine kinase de la sous-unité β . Ceci permet le rapprochement des deux sous-unités β et leur trans-phosphorylation sur les résidus 1146, 1150 et 1151 tyrosine. Le domaine tyrosine kinase est alors activé et peut ainsi phosphoryler d'autres tyrosines présentes sur les chaînes β ou sur des protéines substrats voisines (151; 153).

L'activation de l'IR déclenche des cascades signalétiques qui passent par la phosphorylation des protéines IRS. Les deux principales voies connues sont celle de la PI3K-Akt/Protéine Kinase B (PKB), responsable de la plus grande partie des effets métaboliques de l'insuline (154-157), et celle de la Ras-MAPK, qui régule l'expression de certains gènes et coopère avec la voie des PI3K pour contrôler la prolifération et la différenciation cellulaires [Revue dans (158)] (Figure 2-4). À la différence des autres RTKs qui lient par leur extrémité cytoplasmique les protéines effectrices de signalisation (159), le récepteur à l'insuline et l'IGF1R transmettent leurs signaux activateurs via une protéine satellite : l'IRS. L'activation des IRS se fait par phosphorylation de leurs résidus tyrosines par l'IR. Les IRS se lient ainsi à des molécules intracellulaires contenant le domaine SH2 (*Src-Homology-2*) comme la PI3K, la protéine Shc (*Src-homology-2-containing protein*) et la protéine GRB-2 (*Growth factor Receptor-Bound protein-2*). Celles-ci s'associent alors à la protéine SOS pour activer la voie Ras-MAPK (149; 152; 160; 161) (Figure 2-4).

La PI3K catalyse alors la phosphorylation de lipides membranaires formant ainsi des PI(3,4,5)P₃, qui permettent l'attachement de la protéine Akt à la membrane plasmique. Ainsi positionnée, la protéine Akt peut être activée par les PDK1/2, lesquelles entraînent la phosphorylation d'autres protéines relais intracellulaires impliquées dans les effets métaboliques de l'insuline. Par exemple, la phosphorylation de la GSK3-beta favorise la synthèse de glycogène et la phosphorylation de la PKC atypique impliquée dans la translocation à la membrane des transporteurs de glucose à partir d'un pool intracellulaire vers la surface membranaire (152). Des études ont démontré l'implication directe d'Akt/PKB dans le transport du glucose et la translocation des GLUT1 et GLUT4 à la membrane plasmique (155). De son côté, la voie de la MAPK peut être activée par deux voies, soit par la protéine IRS ou par la Shc. Premièrement, les IRS lient Grb2 permettant d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS qui, pour sa part, active la MAPK, qui activera la kinase p90rsk impliquée dans la synthèse protéique (152). Deuxièmement, Shc peut être activé par l'IR et reconnaître la protéine Grb2 qui activera la voie de Ras (152).

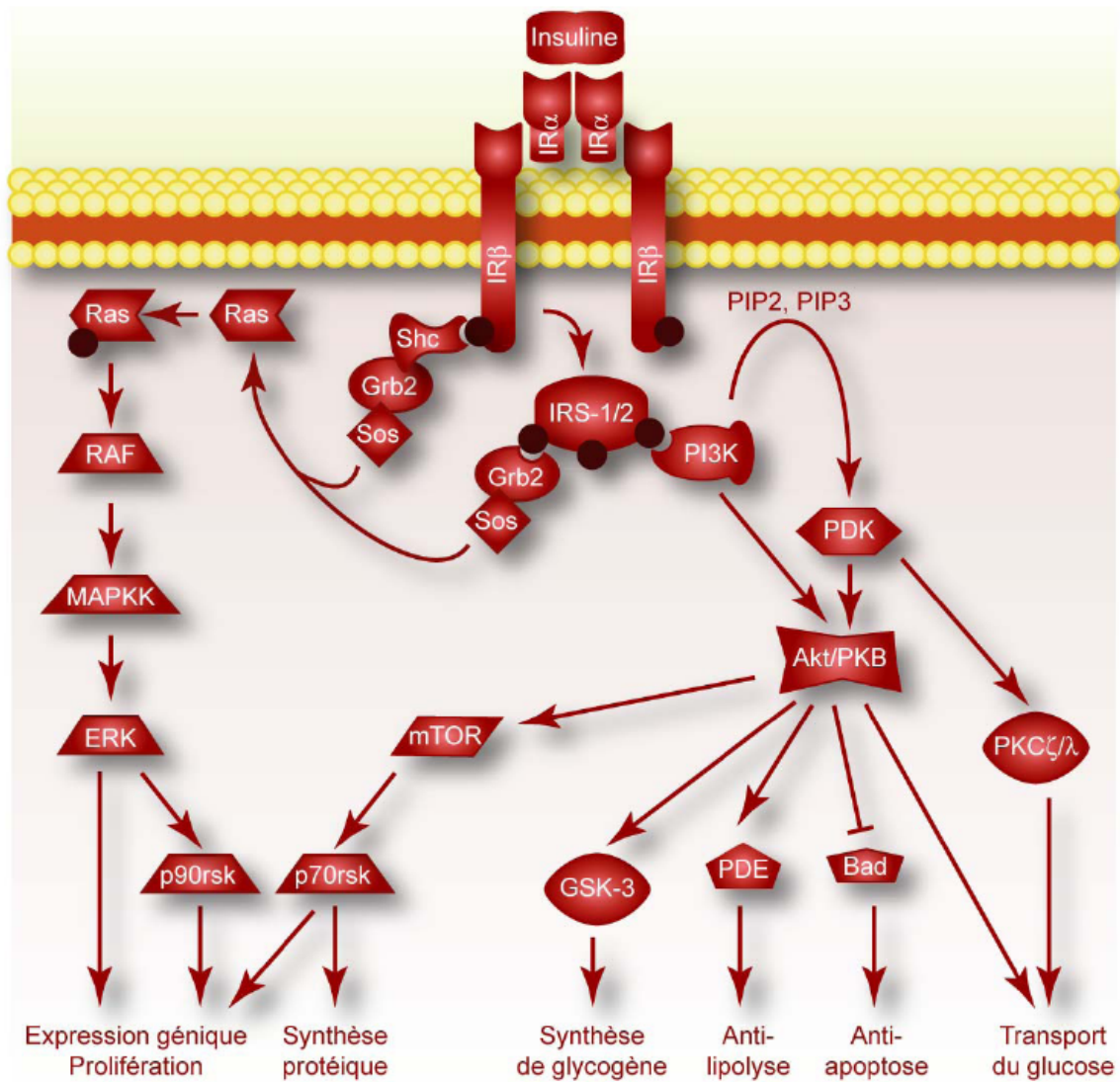


Figure 2- 4 Voies de signalisations de l'insuline (152; 162).

Les voies de signalisation de l'insuline peuvent ainsi induire différentes actions dans les cellules vasculaires comme la prolifération cellulaire, l'expression des gènes, la synthèse des protéines et l'incorporation du glycogène. Certaines cellules, comme les CE, internalisent l'insuline et la transportent dans leur cytoplasme sans la dégrader pour la transporter au travers une barrière, alors que d'autres types cellulaires, comme les hépatocytes et les adipocytes, sont chargés de la dégradation (163; 164).

d) Le contrôle négatif du signal insulinique

La signalisation insulinique s'achève par la dégradation de l'hormone en des endosomes intracellulaires après son internalisation avec son récepteur (152). L'IR est ensuite recyclé vers la membrane. À l'état physiologique, la synthèse de nouveaux récepteurs permet de conserver une quantité constante d'IR dans la cellule pour remplacer les protéines dégradées dans l'internalisation et maintenir une sensibilité à l'insuline stable. Toutefois, une hyperinsulinémie soutenue augmente l'internalisation des récepteurs et stimule leur dégradation pour enfin diminuer leur nombre à la surface de la cellule en guise de rétrocontrôle négatif qui peut mener, à plus long terme, vers une résistance à l'insuline.

D'autre part, il existe des protéines inhibitrices de l'IR. Les plus connues sont les tyrosines phosphatases (PTP, *Protein Tyrosine Phosphatases*) dont la plus étudiée est la PTP1B qui réduit l'activité des IR en déphosphorylant leurs sous-unités β . D'autres protéines comme les SOCS1 et 3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*), GRB-10 et glycoprotéine-1 de la membrane plasmique cellulaire (PC1, *Plasma-Cell-membrane glycoprotein-1*) inhibent la fonction de l'IR en bloquant son interaction avec IRS ou en inhibant son activité kinase (156).

Le TNF α , cytokine inflammatoire de phase aiguë, inhibe aussi la voie de signalisation de l'insuline (Figure 2-4). Plusieurs études ont révélé que lorsque le TNF α circulant est augmenté, l'activité tyrosine kinase de l'IR était diminuée. Ainsi, cette cytokine réduit les effets biologiques de l'insuline en agissant sur la première étape intracellulaire de la voie de signalisation de cette hormone (165; 166). Cette diminution d'activité semble être en grande partie responsable de l'état de résistance à l'insuline via le TNF α observé lors de l'obésité (167; 168). En effet, la neutralisation de TNF α chez des rats Zucker fa/fa génétiquement obèses conduit à une meilleure autophosphorylation de l'IR (169). D'ailleurs, le traitement de lignées cellulaires en culture par du TNF α induit une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (167). Cet effet inhibiteur passe via la p38MAPK et la PTP, tous deux inhibiteurs de l'IR (170; 171).

B. Le diabète

Le diabète est l'une des premières causes de mortalité dans le monde. Si en 2000, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) estimait le nombre de diabétiques (types 1 et 2 confondus) à plus de 176 millions dans le monde, le nombre s'élèverait à 246 millions d'individus environ de nos jours. L'OMS prévoit 370 millions de diabétiques à travers le monde d'ici 2030 (172). La majeure partie d'entre eux seront des diabétiques de type 2.

Le diabète est un syndrome clinique hétérogène caractérisé par des désordres du métabolisme glucidique, lipidique et protéique menant à des altérations biochimiques et

structurales. Le diabète se manifeste cliniquement par une hyperglycémie résultant d'une altération de la sécrétion de l'insuline, d'une résistance à l'insuline ou de la combinaison de ces deux altérations (173; 174). Les symptômes reliés à une hyperglycémie marquée incluent la polyurie, la polydipsie, la perte de poids ainsi qu'une vision trouble (173). Une hyperglycémie non contrôlée peut conduire à une morbidité significative sous forme d'atteintes cardiovasculaires, oculaires et rénales ainsi qu'une susceptibilité accrue à certains types d'infections. Plusieurs de ces complications augmentent la mortalité et diminuent l'espérance de vie du patient diabétique.

La nouvelle classification du diabète par la ADA (*American Diabetes Association*) décrit quatre grandes catégories de diabète (174):

1. Diabète de type 1 (DT1) insulino-dépendant.
2. Diabète de type 2 (DT2) insulino-indépendant.
3. Différents types de diabète spécifique [MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) ou LADA (*Late Autoimmune Diabetes of the Adult*)...].
4. Diabète gestationnel.

En 1997 et 2003, le Comité expert du diagnostic et de la classification du diabète (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*) reconnaît un groupe intermédiaire présentant une glycémie élevée, situé entre celui des diabétiques et celui des sujets normaux. Ceux là ont été définis comme des personnes ayant une perturbation de la glycémie à jeun (IFG ; *Impaired Fasting Glucose*) [Glycémie à jeun entre 5.6 mmol/L et 6.9 mmol/L] ou une perturbation de la tolérance au glucose (IGT ; *Impaired Glucose Tolerance*) [Glycémie après 2hr d'une injection de 75g de glucose [test de tolérance au glucose oral (OGTT, *Oral Glucose Tolerance Test*)] entre 7.8 mmol/L et 11 mmol/L]. Ils sont désormais définis des pré-diabétiques indiquant un risque relativement élevé de développement du diabète (Figure 2-5).

La Commission experte pour le diagnostic et la classification du diabète de l'ADA établit 4 nouveaux critères de diagnostics en 2009 (174). Le diabète chez un patient est désormais défini quand, au moins, l'un des 4 facteurs suivants est décelé :

- 1) Taux d'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) ≥ 6.5%**
- 2) Glycémie à jeun ≥ 7,0 mmol/L**
- 3) Glycémie après un OGTT ≥ 11,1 mmol/L**
- 4) Glycémie aléatoire ≥ 11,1 mmol/L + symptômes de diabète**

Aléatoire = à tout moment de la journée, sans égard au moment du dernier repas

Symptômes de diabète classiques = polyurie, polydipsie et perte de poids inexpliquée

Le dosage de l'HbA_{1c} est utilisé comme marqueur d'une hyperglycémie chronique reflétant la moyenne de la glycémie systémique sur une période de 2 à 3 mois (174). Il est donc un critère important de l'équilibre glycémique et sa valeur est corrélée à l'incidence des complications tardives selon l'ADA. Cependant, selon les critères de l'Association canadienne du diabète, le dosage de l'HbA_{1c} n'est pas un critère de diagnostic du diabète. Seuls les trois derniers le sont (175).

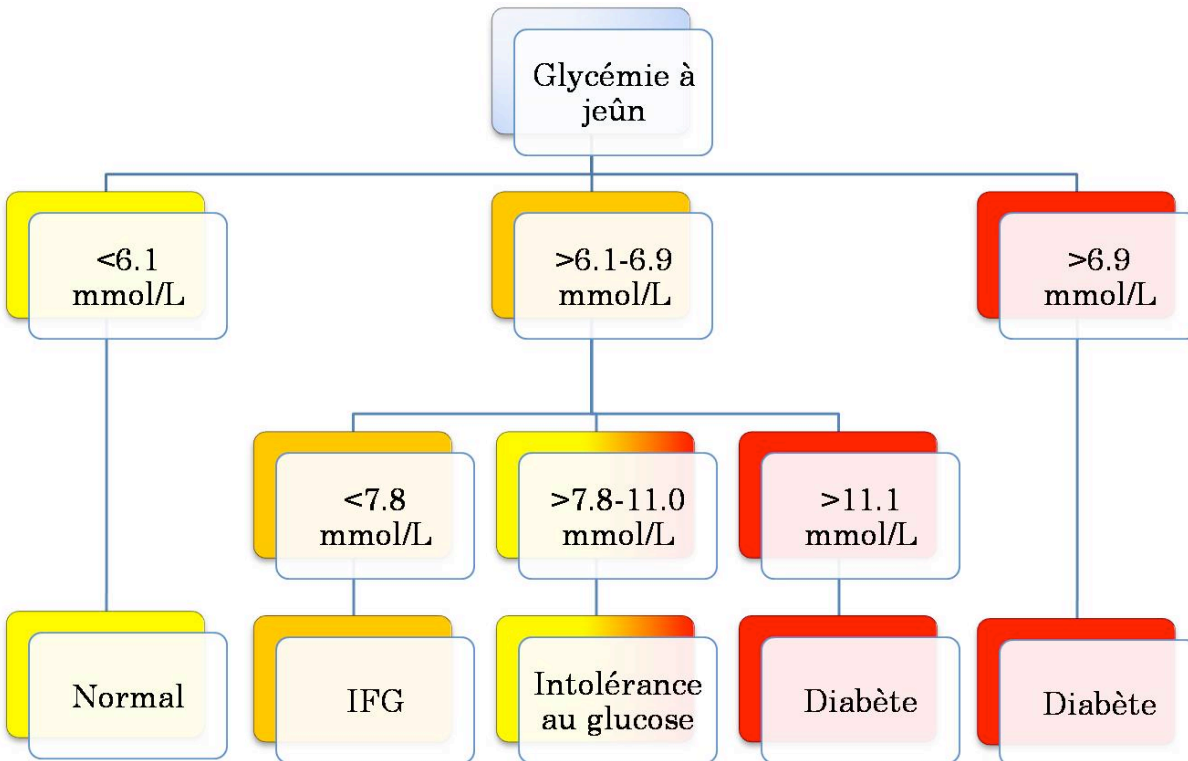


Figure II-1 Paramètres de caractérisation du diabète (173; 174).

1. Le diabète de type 1

En général, il est admis que le DT1 survient chez des personnes à prédisposition génétique. Ceci n'exclut pas le rôle potentiel de certains facteurs environnementaux (virus, toxines chimiques et/ou cytotoxines) dans l'apparition de ce type de diabète. C'est une maladie auto-immune qui peut se manifester à tout âge mais se développe essentiellement chez les jeunes (d'où sa dénomination diabète « juvénile »). Chez ces

individus, une infiltration lymphocytaire dans le pancréas résulte en une destruction chronique des cellules β des îlots de Langerhans. Par conséquent, la sécrétion d'insuline est diminuée voire abolie, entraînant ainsi une hyperglycémie physiologiquement non contrôlée (d'où sa dénomination de diabète sucré, diagnostiqué autrefois par la présence le goût du sucre dans l'urine).

Les anomalies métaboliques associées au DT1 sont nombreuses. La diminution voire l'absence d'insuline conduit par exemple à une augmentation de la sécrétion du glucagon et de ses effets systémiques (stimulation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse et inhibition de la glycogénèse et de la glycolyse). Tout ceci a pour conséquence une hyperglycémie accrue du fait de la diminution de la capture glucidique corrélé à l'absence de stimulation insulinaire. La conséquence d'une hyperglycémie maintenue pendant une longue durée est une augmentation de la cétogenèse hépatique menant à une acidocétose pouvant être mortelle.

2. Le diabète de type 2

La sensibilité d'une cellule à l'insuline dépend également du nombre des IR exprimé par celle-ci mais aussi de l'affinité de cette hormone à son récepteur sur la cellule. L'hyperglycémie associée au DT2 est due, pour une grande partie, à une altération des fonctions du récepteur de l'insuline. Il en résulte un manque de stimuli insulinaire au sein des cellules cibles, notamment musculaires, adipeuses et hépatiques, et une détérioration de l'homéostasie glucidique du fait de la diminution de la capture et de l'utilisation du glucose par ces cellules. Le maintien de l'hyperglycémie systémique provoque la surproduction d'insuline par les cellules β pour contrecarrer ce phénomène. La résultante est une hyper-insulinémie systémique (173; 176).

Cette pathologie se déclenche généralement à l'âge adulte, voire avancé, chez des individus généralement obèses et constitue la forme de diabète la plus répandue dans le monde ($\geq 90\%$). Étant donné que l'hyperglycémie se développe progressivement et reste longtemps asymptomatique, le DT2 demeure longtemps non remarqué et des complications micro-vasculaires (rétinopathie, néphropathie, neuropathie, etc.) et macro-vasculaires (maladie coronarienne et maladie vasculaire périphérique, etc.) peuvent déjà être présentes lors du diagnostic (176; 177). C'est pour cela que souvent des complications cardiovasculaires sont présentes dès la découverte du DT2 (23).

Au début de la maladie, la production d'insuline par le pancréas est normale (Figure 2-6). Elle démarre par une phase d'intolérance au glucose caractérisée par une résistance à l'insuline. Pour compenser l'inefficacité de l'insuline et maintenir la glycémie dans les limites de la normale, les cellules β de Langerhans vont produire d'avantage d'insuline pour tenter d'augmenter la capture du glucose par les cellules. À un

stade avancé de la maladie, la production insulinique des cellules β va diminuer et tendre progressivement à sa disparition. En parallèle de cette étape tardive du développement de la maladie, l'hyperglycémie s'installe progressivement et conduit à une glucotoxicité qui accentue la destruction des cellules β (178). Un cercle vicieux est alors enclenché et l'insulino-résistance travaille en synergie avec la diminution de la sécrétion d'insuline pour aggraver le diabète.

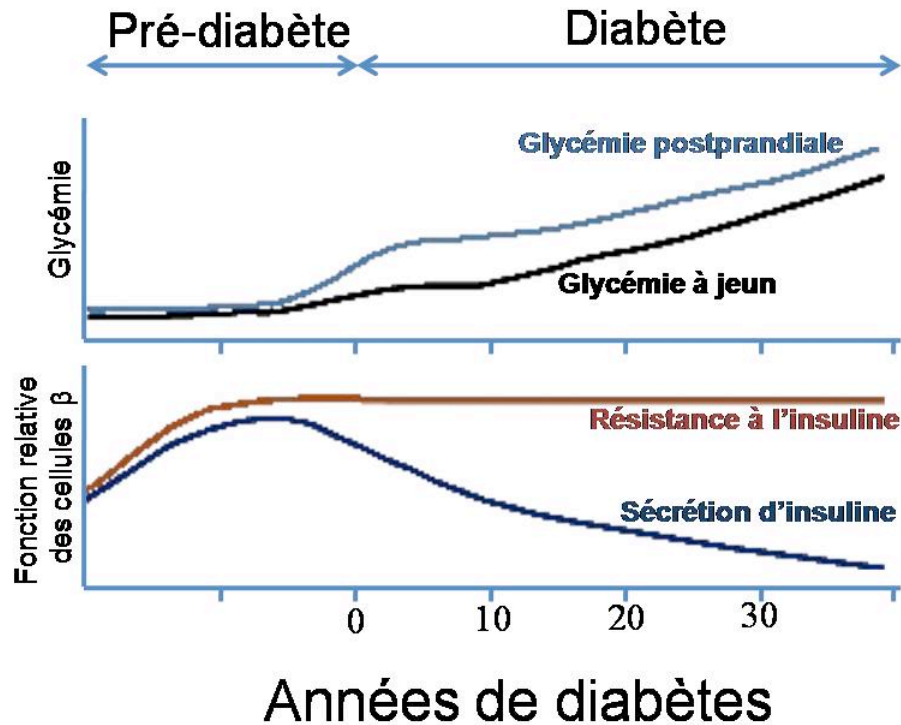


Figure II-2 Évolution du diabète (178; 179).

a) **La résistance à l'insuline**

Dans certaines conditions physiologiques (l'âge, la croissance, la grossesse) et pathologiques (intolérance au glucose, DT2, obésité, stress, maladies chroniques), l'action cellulaire de l'insuline est altérée et une résistance à l'insuline peut se développer. L'absence de réponse à l'insuline au niveau périphérique se manifeste essentiellement par une réduction de la glycogénèse pour réduire la glycémie sanguine. Elle induit aussi une diminution du métabolisme glucidique au niveau des cellules. C'est principalement un défaut de l'induction ainsi que de la fonction des transporteurs de glucose GLUT-4 qui sont affectées (180).

L'accumulation ectopique de lipides joue un rôle important dans l'induction de l'insulino-résistance (181). Les molécules inflammatoires et les métabolites lipidiques inhibent aussi la signalisation insulinique en stimulant les différentes kinases responsables de la phosphorylation des sérines et thréonines des IRS et des sous-unités β du récepteur de l'insuline. La phosphorylation des résidus sérine ou thréonine semble antagoniser la phosphorylation des résidus tyrosine, phénomène fort probablement responsable de la perte de sensibilité à l'insuline (153). Les AG non-estérifiés, le diacylglycérol, les acyl-CoA, l'insuline, le glucose et de nombreuses cytokines (TNF- α , l'IL-1 β) peuvent aussi catalyser la phosphorylation des résidus tyrosine et participer ainsi à l'établissement de la résistance à l'insuline. Certains enzymes comme la protéine kinase C (PKC- ζ), la kinase IKK β (*Inhibitor of NF κ B Kinase*), la MAPK et la kinase Jun (JNK, *Jun Kinase*) sont aussi capables de phosphoryler les sérines et thréonines des IRS (Figure 2-4). Par exemple, JNK inhibe l'interaction du site de liaison tyrosine phosphorylé (PTB, *Phospho-Tyrosine Binding*) de l'IRS avec l'IR en phosphorylant la sérine 312 du substrat pour induire une résistance à l'insuline. JNK peut être activée par l'insuline en guise de rétrocontrôle négatif mais aussi par le TNF α et les AG (181-184). Cependant, une hyperinsulinémie persistante mène au développement d'une résistance à l'insuline (185). Cette résistance entraîne une augmentation du taux des AG circulants et conduit à une accumulation de diacylglycérol et d'acyl-CoA dans les muscles et le foie ce qui a pour conséquence d'aggraver l'insulinorésistance étant donné que ces éléments activent la PKC- θ et la phosphorylation de l'IRS1 (186). Un déséquilibre des taux d'adipocytokines, tel qu'observé chez les personnes obèses, stimule l'accumulation de ces substrats du fait de leur rôle dans l'oxydation mitochondriale des AG dans ces tissus (187; 188).

D'autres protéines peuvent aussi influencer la signalisation insulinique comme les phosphatases PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome ten*) et SHIP (*Src Homology 2 domain-containing Inositol 5-Phosphatase*), qui préviennent l'activation de la PI3K et empêchent l'activation de la cascade afférente (Figure 2-4). La famille des protéines GRB7, 10 et 14, SOCS et PKC ζ peut aussi inhiber le signal insulinique (189).

3. Le diabète de type MODY

Le terme MODY est apparu en 1964, quand le diabète était considéré comme ayant 2 formes principales : à établissement juvénile et à établissement mature correspondant grossièrement aux types 1 et 2 du diabète tels qu'utilisés aujourd'hui. MODY était généralement associé aux jeunes et aux adolescents qui avaient une hyperglycémie asymptomatique persistante sans aucune acidocétose apparente. Rétrospectivement, nous pouvons reconnaître dans cette catégorie une collection

hétérogène de désordres métaboliques incluant le diabète autosomal dominant, connu de nos jours sous le terme MODY, mais aussi ce qu'on définit à présent par le DT2 qui se produit chez les enfants ainsi que quelques cas d'hyperglycémie (par exemple : diabète mitochondrial ou lié à la mutation de l'IR). Plusieurs de ces patients étaient traités avec les sulfonylurés avec différents degrés de succès.

Dans les années 1990, avec la compréhension de la physiopathologie du diabète, le concept et l'usage de « MODY » se sont raffinés et redéfinis. Le terme MODY regroupe maintenant toutes les formes de diabètes héréditaires causés par une mutation d'un gène autosomal dominant qui peut se produire à tout âge. Ces mutations affectent la production d'insuline par les cellules β pancréatiques. À la différence des DT1 et DT2 qui sont polygéniques récessifs causés par des mutations de gènes non hérités des parents, MODY est monogénique et mieux contrôlable. Jusqu'en 2004, six types de cette forme de diabète ont été reportés, mais les formes MODY2 et MODY3 sont les plus communes (190).

Récemment, deux nouveaux types ont été rajoutés à cette liste : MODY 7 (191) due à la mutation du gène Kruppel-like factor 11 et MODY 8 (192) due à la mutation du gène de la lipase dépendante des sels biliaires (BSDL, *Bile Salt Dependent Lipase*). La sévérité des différents types varie considérablement, mais les plus communs agissent comme un début du DT1, avec une production faible d'insuline et une insulino-sensibilité normale.

4. Les autres types de diabète

Il existe des formes inhabituelles du diabète causées par des anomalies génétiques altérant l'action de l'insuline. Notamment lié à une mutation du gène codant du récepteur à l'insuline, ce syndrome fut initialement nommé le diabète de type A. Il regroupe de nos jours le syndrome de Leprechaunism et le syndrome de Rabson-Mendenhall, deux formes juvéniles du diabète de type A dues à des mutations génétiques du récepteur à l'insuline causant une résistance sévère à l'insuline. Alors que le premier peut être létal dans la majorité des cas, le second est associé à une absence de dentition et d'ongles ainsi qu'à une hyperplasie de la glande pinéale (173).

Le diabète gestationnel, quant à lui, est un diabète qui ne survient que pendant la grossesse et chez certaines femmes. En effet, durant la grossesse, les besoins en insuline augmentent. Si la fabrication d'insuline demeure insuffisante alors le diabète apparaît.

C. Les facteurs de risque du diabète

En ce qui concerne le diabète de type MODY, essentiellement causé par des facteurs génétiques, il n'existe aucun facteur de risque modifiable caractéristique, ce qui limite les possibilités de prévention.

Le DT1 résulte surtout de la destruction des cellules β du pancréas. Cette forme de diabète comprend les cas attribuables à un processus auto-immun et d'autres cas dont la cause de la destruction des cellules β est inconnue avec une prédisposition à la base génétique.

Par ailleurs, les facteurs de risque du DT2 sont multiples. Le surplus de poids et le manque d'exercice sont les principaux facteurs de risque sur lesquels un traitement peut agir très favorablement étant donné leur influence considérable sur le risque d'apparition de cette pathologie. Dans les populations sédentaires nourries avec un régime riche en gras, la prévalence du DT2 augmente chez les adultes proportionnellement au gain pondéral (193-195). D'autres facteurs de risques, tels l'âge, le groupe ethnique, le tabagisme et l'alcool influencent le développement du DT2 (195).

D. Les atteintes liées au diabète

Les complications cardiovasculaires sont les principales causes de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques. Elles affectent différents tissus et organes tels la rétine, le myocarde, les nerfs, la peau et les reins (196). De plus, l'incidence d'une atteinte cardiovasculaire est deux fois plus élevée chez les patients diabétiques par rapport aux individus non diabétiques du même âge (197; 198). Par ailleurs, la mortalité chez ces patients entre 30 et 55 ans peut atteindre 33 % alors qu'elle n'est que de 6 % chez des individus non diabétiques du même âge (198). L'influence du diabète sur les altérations cardiovasculaires est synergique à celle d'autres facteurs comme l'âge, l'hypercholestérolémie, l'hypertension et le tabagisme (199; 200). Le taux de mortalité diffère selon le type de diabète.

1. Le diabète et l'athérosclérose

De nos jours, il est bien établi que l'athérosclérose est un processus inflammatoire chronique et non un simple processus dégénératif s'opérant avec l'âge. Le diabète est un des facteurs contribuant à l'établissement et au développement du processus inflammatoire caractéristique de l'athérosclérose. Ce concept est supporté par des études

montrant que des échantillons de plaque provenant d'un diabétique comprennent beaucoup plus de macrophages que le spécimen d'un patient non diabétique (201).

Comme cela a été présenté précédemment, la lésion athérosclérotique commence par une strie lipidique due à l'infiltration de LDL dans la partie sous endothéliale où il sera oxydé. Avec l'oxydation des LDL, les CE sont stimulées pour libérer des chémio-attractants permettant ainsi le recrutement des monocytes à la paroi vasculaire, leur infiltration à travers l'intima et leur métamorphose en macrophages, puis en cellules spumeuses (35). Le diabète accélère cette séquence d'événements de plusieurs façons.

Tout d'abord, le diabète agit au niveau de la dysfonction endothéliale. En effet, une altération de la vasodilatation liée au NO a été établie chez les diabétiques (202; 203). Des souris déficientes pour la iNOS ont démontré des symptômes comparables à ceux des souris diabétiques: une absence de réponse à l'acétylcholine et une diminution de la relaxation vasculaire (204). Cette étude a aussi montré que la déficience de la vasorelaxation chez les diabétiques était iNOS dépendante. Les oxLDL, qui sont présents en grandes quantités chez les diabétiques, pourraient être la cause de la diminution de l'activité de la iNOS et de la eNOS chez cette population (205-207).

2. La rétinopathie diabétique

Cette pathologie est une atteinte micro-vasculaire de la rétine observée chez la majorité des diabétiques (208). La lésion initiale de la rétinopathie diabétique est l'épaississement de la membrane basale des capillaires rétiniens à laquelle s'associe une diminution du nombre des cellules de soutien des capillaires rétiniens et une diminution du nombre des CE. Ceci conduit à des altérations de l'irrigation sanguine de la rétine, à la formation d'anévrismes et à une occlusion des vaisseaux rétiniens le tout pouvant conduire à la cécité (208). La rétinopathie diabétique est la première cause de cécité avant l'âge de 50 ans. D'une façon globale, 2% des diabétiques perdent la vue après 15 ans du diagnostique de la maladie (209).

3. La néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est une des principales causes d'insuffisance rénale des diabétiques nécessitant la dialyse (210). Elle est essentiellement caractérisée par une atteinte des glomérules rénaux. Entre 35 et 57 % des diabétiques de type 1 et entre 25 et 46 % des diabétiques de type 2 développent une néphropathie diabétique cliniquement détectable par l'apparition de substances inhabituelles dans les urines (albumine par exemple) (211-214).

4. La neuropathie diabétique

Les risques d'atteinte nerveuse augmentent avec la durée du diabète et surviennent relativement tardivement dans les pathologies par rapport aux autres altérations liées au diabète (215). Les atteintes nerveuses surviennent à cause d'une ischémie conduisant à un manque d'irrigation des cellules nerveuses très sensible au manque d'O₂. La neuropathie touche surtout les membres inférieurs des diabétiques mais peut aussi affecter le système nerveux autonome ; les deux causant des altérations et des troubles multiples selon la région concernée (209; 216).

E. Les traitements du diabète

Le premier traitement du diabète est basé sur un plan alimentaire organisé associé à un programme sportif. Ce traitement est associé, chez les diabétiques de type 1, à des injections quotidiennes d'insuline dès l'apparition de la maladie. Dans le cas du DT2, si les premières mesures de traitement échouent après un mois, un traitement antidiabétique est alors nécessaire (217). Les substances actuellement disponibles sont les thiazolidinediones (TZD) et les biguanides substances augmentant l'insulino-sensibilité, les sulfonylurées qui augmentent la sécrétion de l'insuline et les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase qui ralentissent la captation intestinale du glucose.

1. Les thiazolidinediones

Les TZD améliorent la sensibilité à l'insuline, aussi bien au niveau musculaire qu'au niveau hépatique et adipocytaire. Ainsi, en stimulant les récepteurs nucléaires PPAR γ , les TZD augmentent la consommation musculaire du glucose et d'AG, inhibent la glycolyse hépatique et diminuent la libération d'AG dans le sang (218-221). La stimulation de PPAR γ au niveau des adipocytes, conduit, par ailleurs, à la production de l'adiponectine, adipokine insulino-sensibilisante, et à la stimulation de l'adipogenèse (220; 221), deux processus améliorant l'homéostasie sanguine.

Les effets des TZD sur la glycémie sont lents et progressifs pour atteindre un effet maximal après 12 semaines (222).

Plusieurs membres de cette famille sont utilisés pour le contrôle du DT2 parmi eux, la Rosiglitazone (Avandia®) et la Pioglitazone (Actos®).

2. Les biguanides (metformine)

La famille des biguanides, puissants insulino-sensibilisants et inhibiteurs de la glucogénèse, est un traitement de choix pour les patients présentant un DT2 associé à un syndrome métabolique. En effet, ces patients présentent une insulino-résistance accrue associée à l'obésité et la dyslipidémie. Cette famille agit également sur la dyslipidémie, l'hyperinsulinémie et l'obésité de ces patients pour améliorer son effet contre le diabète (223).

Ces deux types de substances (biguanides et TZD) peuvent être considérées comme des sensibilisateurs à l'action de l'insuline nécessitant la présence d'insuline pour pouvoir développer leurs effets.

3. Les autres types de traitement

Les sulfonylurées stimulent la sécrétion de l'insuline en activant le canal potassique ATP-dépendant des cellules β du pancréas. Le repaglinide et les analogues de la phénylalanine stimulent aussi la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques mais par une action distincte des sulfonylurées.

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont une autre classe de médicaments qui agit au niveau de l'absorption intestinale des sucres. En effet, ces médicaments inhibent l'activité de l' α -glucosidase des villosités de l'intestin responsable de la transformation des polysaccharides en monosaccharides. Ceci limite le passage intestinal des polysaccharides dans le sang et diminue ainsi la glycémie postprandiale.

III. Le tissu adipeux et PPAR γ

A. Le tissu adipeux

Toutes les espèces animales ont besoins de stocker de l'énergie dans leur organisme pour des utilisations futures en cas de manque d'apport nutritif. La plupart des espèces entrepose cette énergie sous forme de gras dans un tissu d'origine mésodermique : le tissu adipeux. Ce tissu, principale source de réserve énergétique de l'organisme, joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il contribue au stockage des réserves énergétiques sous forme de triglycérides et à la sécrétion de protéines interférant avec les métabolismes glycémique et lipidique. C'est un tissu conjonctif aréolaire (arrangement lâche de ses fibres) composé majoritairement de cellules adipeuses dérivées embryologiquement des cellules mésenchymateuses qui se différencient en pré-adipocytes. Il contient aussi des fibroblastes, des macrophages et des mastocytes. Les adipocytes y sont organisés en groupes appelés lobules, séparés par des septa de fibrilles de pré-collagène infiltrés d'une micro-vascularisation et d'une innervation bien élaborée témoignant de leur grande activité métabolique.

Le stockage de réserves énergétiques sous forme de graisses est une fonction naturelle du tissu adipeux mais le tissu adipeux est aussi une glande endocrine qui sécrète une panoplie de produits solubles qui manifestent des actions endocrines, paracrines et autocrines. Ces substances sécrétées sont des hormones et cytokines regroupées sous le terme d'adipocytokines. Elles ont des rôles métaboliques importants pour la fonction de divers organes (cœur, muscle squelettique, foie, etc.) et systèmes (le système immunitaire, le système nerveux, le système digestif et le système sanguin). Ces cytokines, sécrétées suite à des stimuli neuronaux, hormonaux et/ou alimentaires, agissent au niveau de la satiété, de la thermogénèse, de l'immunité et des fonctions neuroendocrines (224).

1. La physiologie du tissu adipeux

La localisation du tissu adipeux varie entre les espèces. Chez les invertébrés, les amphibiens et la plupart des reptiles, la grande majorité de la masse grasse est intra-abdominale. Chez les mammifères marins, le tissu adipeux est en grande partie sous-cutané alors que chez les autres mammifères et les oiseaux, les deux formes soit sous-cutanée et abdominale viscérale sont retrouvées (225).

Chez l'homme, le tissu adipeux est réparti dans tout l'organisme (Figure 3-1). Sa localisation dépend de l'âge, du sexe et de l'état physiopathologique de l'organisme (225). Cette distribution dépend également du genre de ce tissu. En effet, on distingue le tissu adipeux blanc du tissu adipeux brun dont la physiologie, la fonction et le rôle dans l'organisme sont différents.

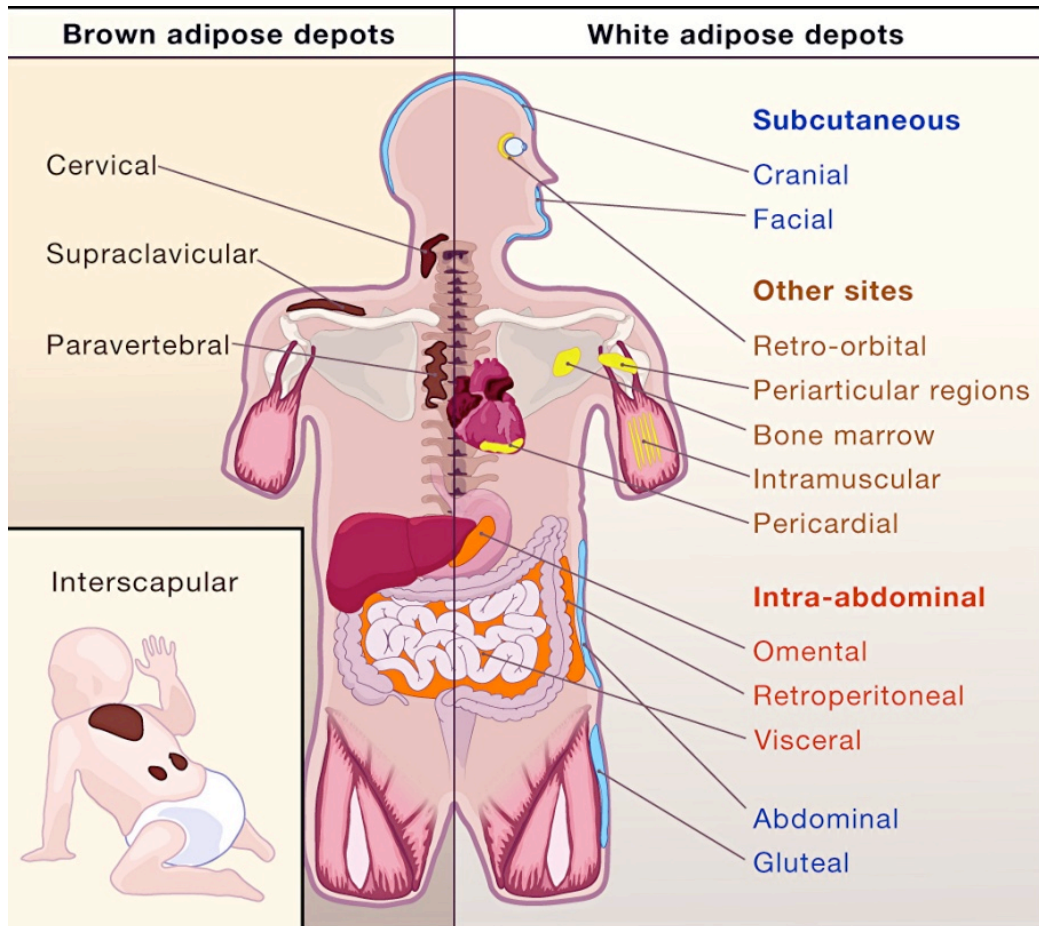


Figure 3- 1 Distribution du tissu adipeux dans l'organisme (225).

a) **Le tissu adipeux blanc**

Le tissu adipeux blanc est réparti sous deux formes : support et stockage d'énergie (225; 226). Ces dépôts tissulaire présentent des variations d'expressions génétiques et des fonctions différentes (227). Les adipocytes blancs de support se trouvent au sein d'un tissu conjonctif lâche caractérisé par la présence entre ses cellules d'une très abondante MEC. Ce dernier a pour fonction de soutenir et de protéger les organes qui les entourent des contraintes mécaniques auxquelles ils font face. Il se renouvelle de façon continue et ne disparaît jamais, même en cas d'anorexie aiguë.

Les adipocytes blancs de stockage énergétique et de sécrétions sont regroupés pour constituer le tissu adipeux blanc. Ces adipocytes sont des cellules sphériques contenant une vacuole lipidique unique qui occupe tout le cytoplasme écrasant les organelles (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, mitochondries, etc.) et le noyau dans un faible espace contre la membrane cellulaire. Ces cellules sont réparties dans tout l'organisme, mais sont particulièrement présentes dans la cavité abdominale et sous la peau. Il s'agit d'un tissu métaboliquement très actif et sensible aux conditions métaboliques de l'organisme; une activité anabolique accrue stimule son hypertrophie alors qu'une carence de l'apport énergétique mène à son hypotrophie. À la température du corps, la graisse est sous forme liquide composée de triglycérides, qui constituent la réserve énergétique et dont le métabolisme est contrôlé par diverses hormones et également par le système nerveux (228).

En plus d'être une réserve d'énergie, le tissu adipeux blanc joue un rôle dans l'homéostasie hydrique de l'organisme et dans la protection de l'organisme contre l'agression par le froid.

b) Le tissu adipeux brun

Chez les mammifères, le tissu adipeux est composé également du tissu adipeux brun. Il est essentiellement présent chez les animaux hibernants du fait de sa nature à produire de la chaleur par lipolyse, ce qui les aide à maintenir une température stable pendant leur sommeil. La thermogénèse se produit par l'action de protéines découplantes (UCP-1, *UnCoupling Protein-1*) dans les membranes des mitochondries des cellules de ce tissu. Ces protéines permettent la dissipation du gradient protonique des mitochondries provenant des déshydrogénations du cycle de Krebs, nécessaire pour la production d'ATP, sous forme de chaleur (229). L'expression de UCP-1, pour sa part, est stimulée sous l'action hormonale (adrénergiques, hormone thyroïdienne). La couleur brune de ce tissu est due à sa riche vascularisation et à la grande présence de mitochondries, qui contiennent la cytochrome oxydase, dans leurs cellules.

Chez l'homme, le tissu brun est bien développé chez le fœtus et le nouveau-né mais tend à disparaître rapidement après la naissance (229). Sa répartition majoritaire est au niveau du cou, du dos, des creux axillaires, mais aussi dans la zone sous-clavière et supra-rénale, le médiastin et le mésentère (Figure 3-1) (230-232). Cependant, de plus en plus d'études se focalisent sur la compréhension de la dynamique et du rôle de ce tissu dans la physiologie humaine (232). En effet, l'ARNm de l'UCP-1 peut être détecté dans le tissu adipeux blanc chez l'humain et son expression est même augmentée par un traitement antidiabétique aux TZD (233).

c) **L'obésité**

L'obésité se développe quand l'énergie ingérée excède l'énergie dépensée dans un organisme. L'augmentation de la masse adipeuse est ainsi indispensable pour rétablir l'homéostasie énergétique et stocker le surplus d'énergie sous forme d'AG. L'expansion du tissu adipeux protège ainsi l'organisme contre la lipotoxicité des AG et le développement de la résistance à l'insuline. Ce phénomène s'opère par une augmentation du nombre de cellules adipeuses ou hyperplasie et par l'augmentation de leur taille ou hypertrophie (234). Toutefois, la balance entre hypertrophie/hyperplasie cellulaire est déterminée en fonction de la localisation du tissu adipeux, de la disponibilité des précurseurs des adipocytes et de la nature des AG stockés (235). Ainsi, un taux faible d'adipogenèse dans le tissu adipeux mène à une hypertrophie adipocytaire, à une diminution de la sensibilité à l'insuline et à l'augmentation de l'insulinémie systémique (236). Cependant, le degré d'altérations métaboliques dépend de la distribution du tissu adipeux. L'augmentation viscérale intra-abdominale de la masse adipeuse promeut un risque élevé d'altérations métaboliques alors que le développement excessif du tissu adipeux dans la partie sous-cutanée de l'organisme induit peu ou aucun risque métabolique (237).

Un régime alimentaire hypocalorique couplé à une activité physique peut réduire la taille des adipocytes mais non pas leur nombre. Pour cela, un rétablissement du poids chez les obèses présentant une hyperplasie adipocytaire est difficile sans une intervention chirurgicale. L'organisme humain possède près de 30 milliards d'adipocytes. En cas d'un apport lipidique accrue, ce nombre peut augmenter jusqu'à dix fois surtout que la limite de stockage lipidique d'un adipocyte est de 1 µg. Dans ce cas, le tissu adipeux recrute de nouveaux préadipocytes pour augmenter sa capacité de stockage (228; 238).

L'obésité peut exister sous l'une des deux formes morphologiques définies (239). La forme androïde, définie surtout chez les hommes, est associée à une augmentation de la testostérone. La forme gynoïde est présente chez les femmes avant la ménopause, chez les hommes présentant une dystrophie de leurs organes génitaux et chez les enfants en retard de puberté (238).

Les différents facteurs d'obésité sont une alimentation riche en gras, la sédentarité et le comportement hormonal, notamment pendant la grossesse chez les femmes. Un obèse ne mange pas forcément plus qu'un non obèse, mais adopte davantage une alimentation riche en calories et en gras (240; 241). Ajoutons à ceci le fait que ces individus souffrent en général d'un manque d'activité physique et d'une dépendance à la vie aisée.

2. L'adipocyte et le stockage lipidique

L'adipocyte possède des récepteurs adrénérgiques à sa membrane cytoplasmique qui jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme lipidique. Les récepteurs α_2 adrénérgiques, sensibles à l'insuline, sont lipogéniques et stimulent le stockage des AG dans la cellule. À l'inverse, les récepteurs β sont lipolytiques et stimulent la sécrétion des AG dans la circulation systémique, notamment en cas de jeûne prolongé.

a) Les triglycérides, les AG et le cholestérol

La digestion des lipides alimentaires débute dans l'estomac, où ils subissent une digestion partielle par des lipases gastriques, et se poursuit dans la lumière intestinale où les émulsions lipidiques sont mélangées avec les sels biliaires et les sécrétions pancréatiques contenant des enzymes digestives. Des monoacylglycérols (MAG), des diacylglycérols (DAG) et des AG non-estérifiés sont ainsi libérés pour former un mélange de micelles capable d'être absorbé et de franchir les membranes des entérocytes. Les AG et les MAG entrent dans les cellules intestinales par diffusion passive ou grâce à des transporteurs intestinaux comme l'IFABP (Intestinal Fatty Acids Binding Protein), le CD36 et la FATP4 (Fatty Acids -Transport Protein-4). Ils sont ensuite re-estérifiés dans le réticulum endoplasmique par le MAG acyltransférase (MGAT) et le DAG acyltransférase (DGAT) pour former le triacylglycérol (TAG). Les phospholipides de l'alimentation sont acylés par la 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour former l'acide phosphatidique qui est à son tour converti en TAG. Le cholestérol alimentaire, quant à lui, est acylé par l'acyl-CoA:cholestérol acyltransférase (ACAT) pour former du cholestérol ester. Le TAG joint le cholestérol ester et l'apolipoprotéine B (ApoB) pour former des chylomicrons, ce qui leur permet de franchir la muqueuse intestinale et d'entrer dans la circulation via la lymphe.

Les triglycérides ou TAG sont composés d'une molécule de glycérol sur laquelle sont greffées des AG issues de l'alimentation. Les AG, unités de base des lipides composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, existent sous 3 formes : saturés, mono et poly-insaturés. Les AG ne circulent pas librement dans le sang mais sont transportés par l'albumine sérique sur laquelle ils se fixent avant d'être livrés aux cellules. Les AG peuvent aussi être synthétisés par les adipocytes à partir du glucose et du pyruvate ou sont sécrétés après la lipolyse des TAG.

Le cholestérol est aussi un élément indispensable à l'organisme du fait de son importance dans la structure et la fluidité des membranes cellulaires et de son implication dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, en plus d'être un constituant essentiel de la bile. Il est produit dans le foie et véhiculé dans le sang par les lipoprotéines de basse et de haute densité (LDL ; HDL, *High Density Lipoprotein*) vers les cellules de l'organisme.

Les HDL récupèrent le cholestérol en surplus dans les organes pour le retourner au foie où il sera éliminé permettant ainsi de réduire son risque athérogénique. À l'inverse, le LDL, pour sa part, permet au cholestérol d'atteindre la paroi artérielle favorisant la formation de plaque d'athéromes. Ainsi, l'excès de LDL et le manque de HDL circulant sont des facteurs de risques des maladies cardio-vasculaires.

3. Métabolisme lipidique

Les processus qui gouvernent le stockage et la libération des lipides sont la lipogénèse et la lipolyse (Figure 3-2). Les TAG du tissu adipeux sont continuellement renouvelés. Les graisses déjà stockées sont dégradées et libérées dans la circulation sanguine alors que de nouvelles molécules sont entreposées.

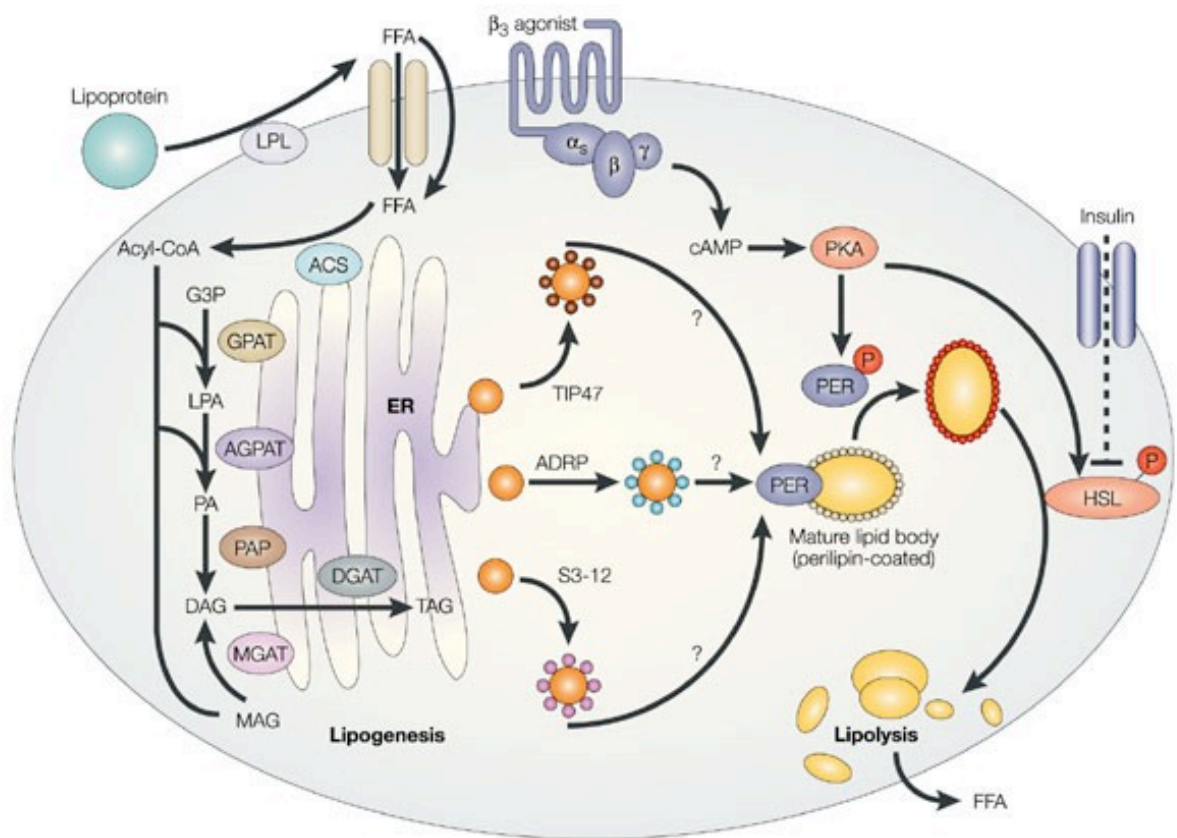


Figure 3- 2 Stockage et mobilisation des lipides dans les adipocytes (242) .

a) La lipogenèse

La lipoprotéine-lipase (LPL), enzyme spécifique de la surface des CE, hydrolyse les triglycérides circulants dans les lipoprotéines plasmatiques pour libérer les AG qui diffusent dans les adipocytes. Ils y seront transformés en acyl-CoA, par l'acyl-CoA synthase (ACS), pour former le substrat de synthèse des TAG dans le réticulum endoplasmique. L'activation de la glycolyse par l'entrée du glucose offre le pyruvate indispensable pour la synthèse des AG et le glycérol 3-phosphate pour la formation des TAG dans les cellules adipeuses (Chapitre 2.1.1) (Figure 2-1). Le glycérol-3-phosphate généré par le métabolisme du glucose est acylé par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) puis l'AGPAT. Le produit est ensuite transformé en DAG par la phosphohydrolase acide phosphatidique (PAP). La deuxième voie alternative implique l'acylation du MAG par la MGAT. Les deux voies mènent à la formation du DAG qui sera acylé en TAG par la DGAT.

La lipogenèse désigne donc l'ensemble de ces processus biochimiques permettant la synthèse des triglycérides contrôlée par l'acétyl-CoA carboxylase. C'est une phase de synthèse dans le processus de réserve énergétique des adipocytes. Le corps humain ne permet la synthèse des triglycérides dans l'adipocyte que par le glycérol activé, c'est à dire dérivé directement du métabolisme des glucides et en quantité régulée par l'insuline. L'insuline est donc un élément essentiel dans la lipogenèse ; elle stimule l'activité de la LPL et celle de l'acétyl-CoA carboxylase favorisant ainsi la transformation du glucose en AG et inhibe la triglycéride lipase hépatique impliquée dans la lipolyse. De plus, elle inhibe l'effet lipolytique du cortisol et des catécholamines. Par ailleurs, l'insuline stimule la synthèse du cholestérol en activant les phosphatases aussi bien dans le foie que dans les adipocytes.

Chez les diabétiques, une insuffisance de la sécrétion ou de l'action de l'insuline provoque une mauvaise utilisation du glucose et une dérégulation de la synthèse des AG. La lipolyse est ainsi activée et l'oxydation des AG et des acides aminés est accrue ainsi que la formation des corps cétoniques au niveau hépatique. La prostaglandine et les œstrogènes à faibles doses ainsi que la leptine sont des molécules qui stimulent la lipogenèse (136).

b) La lipolyse

La lipolyse est totalement l'inverse de la lipogenèse qui consiste à mobiliser les graisses de réserve vers les cellules de l'organisme. Le principal enzyme de ce processus est la triglycéride-lipase qui décompose les triglycérides en AG non estérifiés et en glycérol de sorte que les organes disposent continuellement de lipides pour leurs besoins énergétiques. Les AG sont libérés dans la circulation sanguine sous forme non estérifiée et transportés par l'albumine sanguine pour les fournir aux cellules. Les cellules

musculaires l'utilisent comme substrat pour la production d'énergie dans le cycle de Krebs. Les produits qui résultent de l'utilisation des AG inutilisables sont éliminés au niveau hépatique. Les triglycérides endogènes formés dans le foie à partir du glucose passent dans la circulation sanguine générale via les VLDL et les chylomicrons. Le glycérol libéré de l'utilisation des TAG, ne pouvant plus être utilisé, est capté par le foie qui le métabolise en glucose (néoglucogenèse).

Le système nerveux sympathique a un effet stimulant de la lipolyse via l'adrénaline et la noradrénaline.

4. L'adipogenèse

Le développement du tissu adipeux a lieu essentiellement en période post-natale. Cependant au cours de la vie, une augmentation de la population adipocytaire a lieu à partir du recrutement de précurseurs cellulaires présents dans la fraction vasculaire du stroma de ce tissu : les préadipocytes. La différenciation des préadipocytes participe à l'expansion hyperplasique du tissu adipeux à l'adolescence et au recyclage adipocytaire (10%) à l'âge adulte chez l'humain (236).

Par ailleurs, le développement de la masse adipeuse observé chez les obèses fait intervenir non seulement une hypertrophie des adipocytes existants mais aussi une hyperplasie de ce tissu, ce qui nécessite le recrutement et la différenciation des préadipocytes (228).

a) Étapes de la différenciation adipocytaire

Les adipocytes se développent à partir de cellules souches multipotentes d'origine mésenchymateuses retrouvées dans le stroma vasculaire du tissu adipeux (Figure 3-3). L'engagement des cellules souches multipotentes donne naissance à divers types cellulaires qui auront différentes destinées (243). En présence du stimulus approprié, les cellules souches se différencient en myoblastes, ostéoblastes, chondroblastes ou adipoblastes. BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), polypeptide appartenant à la superfamille des TGF- β , a été démontré comme responsable de l'initiation de la différenciation des cellules souches en adipocyte (244).

Après une phase de croissance exponentielle, les adipoblastes qui présentent un morphotype fibroblastique atteignent un stade de confluence marqué par un arrêt de la multiplication cellulaire. Cette interruption de croissance est requise pour l'engagement vers la différenciation adipocytaire des cellules qui deviennent alors des préadipocytes (245). Ces cellules, en période de latence, reçoivent par la suite une combinaison de

signaux mitogéniques et adipogéniques qui leur permet de procéder à un certain nombre de cycles mitotiques et de se synchroniser : c'est la phase précoce du processus de différenciation. Au cours du développement adipocytaire, le morphotype cellulaire évolue de façon spectaculaire, depuis l'aspect fibroblastique allongé jusqu'à la forme sphérique typique de l'adipocyte mature. De profonds remaniements du cytosquelette cellulaire et de la MEC rendent compte de ces changements majeurs de l'architecture et des interactions cellulaires (246). Également, il a été démontré que le blocage de la phase mitotique inhibe la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures (247). Cette réplication cellulaire limitée correspond à l'amplification clonale des préadipocytes et est contrôlée par l'IGF-I (248).

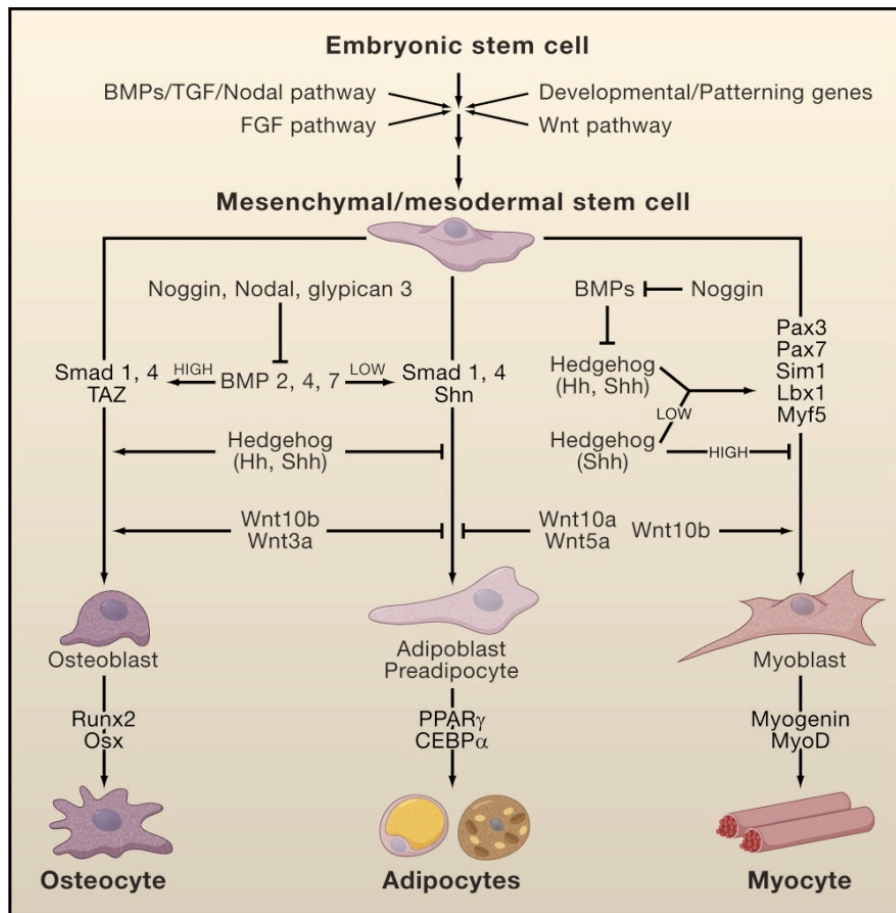


Figure 3- 3 Modèle de développement du tissu adipeux (225; 249).

Au cours de la différenciation terminale, les adipocytes présenteront une capacité lipogénique considérable en rapport avec l'induction d'enzymes spécifiques (G3PDH, acétyl CoA et la lipoprotéine lipase). L'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose GLUT4 et des récepteurs de l'insuline contribuera indirectement à cette lipogénèse accrue. Ceci se traduit par l'accumulation progressive dans le cytoplasme de vacuoles lipidiques qui augmentent de volume et fusionnent. Les adipocytes acquièrent

parallèlement une plus grande capacité de mobilisation des triglycérides (voie lipolytique) qui fait essentiellement intervenir une induction de l'expression des récepteurs β -adrénergiques et de l'enzyme-clé de la lipolyse, la lipase hormonosensible. Pour neutraliser un éventuel effet toxique des AG libérés par la lipolyse et assurer le transport intracellulaire des lipides, la cellule produit de façon massive une protéine de transport des acides gras (aP2 ou ALBP, *Adipocyte Lipid Binding Protein*). Enfin, la cellule adipeuse devient capable de synthétiser et de sécréter de nombreux facteurs agissant de façon autocrine, paracrine ou endocrine. La nature endocrine de l'adipocyte est bien illustrée par la production et la sécrétion de la leptine qui, par voie systémique, règle au niveau central la dépense énergétique et les sensations de faim et de satiété.

b) Facteurs modulant l'adipogenèse

Un apport énergétique riche en gras, particulièrement en gras saturés, induit l'hypertrophie et l'hyperplasie du tissu adipeux. Les AG polyinsaturés sont plus efficaces pour stimuler la différenciation des préadipocytes (250); effet probablement relié à la capacité des AG polyinsaturés d'agir comme ligands ou précurseurs de ligands pour PPAR- γ . Par ailleurs, certaines prostaglandines peuvent induire positivement l'adipogenèse. La prostacycline par exemple, un métabolite majeur de l'acide arachidonique, stimule l'adipogenèse en se liant au récepteur prostanoïque couplé aux protéines G sur les préadipocytes (250; 251).

En plus des AG, des hormones (insuline, testostérone, œstrogène, etc.) et des facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF, TGF- β , etc.) en liaison avec l'adipogenèse agissent au niveau de récepteurs membranaires des préadipocytes pour transmettre les signaux au milieu intracellulaire et initier leur différenciation. Les facteurs qui contrôlent l'adipogenèse agissent en activant les cascades de transcription qui induisent la mitose, la lipogenèse et la capture de lipide. En parallèle, la lipolyse est inhibée pour coordonner les différents processus régulant la différenciation.

La présence d'insuline est essentielle pour l'adipogenèse (252). Les préadipocytes expriment peu de récepteurs insuline certes, mais son action passe par l'activation du récepteur de l'IGF-1 (253). En effet, l'insuline stimule l'activité de la p38 MAPK (254), protéine qui déclenche la différenciation spontanée des préadipocytes (255). Par ailleurs, l'insuline a aussi un impact sur d'autres facteurs de transcription tel le BMP2 qui a un effet adipogénique minime sans son interaction avec l'insuline (256).

Les glucocorticoïdes sont aussi de puissants inducteurs de l'adipogenèse (257). Les récepteurs des corticoïdes sont présents dans les préadipocytes humains (258) et leur activation induit l'expression des protéines C/EBP- δ (*CCAAT-Enhancer Binding Proteins delta*) (259) et PPAR- γ (260), deux récepteurs nucléaires impliqués dans l'adipogenèse.

L'enzyme 11- β -hydroxystéroïd-déhydrogénase 1 (11BHSD1) qui assure la conversion de la cortisone inactive en cortisol active, est exprimée dans les préadipocytes et les adipocytes ce qui a pour effet de sensibiliser le tissu adipeux aux glucocorticoïdes (261; 262). Aussi, les souris déficientes en 11BHSD1 ont une adiposité réduite (262) alors que l'obésité est associée à une surexpression de 11BHSD1 dans le tissu adipeux (263; 264). Cette production locale de cortisol joue donc un rôle paracrine pour induire l'adipogenèse.

Du reste, l'adiponectine, dont la sécrétion par les adipocytes est inhibée par l'obésité (265), a été rapportée comme étant un facteur stimulant la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 en adipocytes (266). Elle permet l'expression prolongée et intense des gènes clés de l'adipogenèse et augmente l'insulino-sensibilité durant la conversion des préadipocytes.

c) Facteurs transcriptionnels de l'adipogenèse

Au cours des dernières années, plusieurs facteurs transcriptionnels jouant un rôle séquentiel et coopératif dans le déroulement de la différenciation adipocytaire ont été identifiés. Il s'agit essentiellement de facteurs de la famille des C/EBP (*CCAAT-Enhancer-Binding Proteins*) et des PPAR, ainsi que de la famille des protéines à motif Hélice-Boucle-Hélice (HLH, *Helix Loop Helix*).

➤ La famille des C/EBP

Cette famille de récepteurs nucléaires comprend 3 membres, C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ , tous impliqués dans la différenciation adipocytaire. Ces facteurs de transcription possèdent un domaine de liaison à des séquences CCAAT présentes dans les régions régulatrices des gènes cibles. Suite à leur activation, ces récepteurs s'homo-dimérisent ou s'hétéro-dimérisent avec d'autres membres de la famille des C/EBP avant d'exécuter leur fonction de transcription.

Au cours du processus de différenciation, les C/EBP β et C/EBP δ émergent, précocement activés par les inducteurs de la voie de l'AMPc et les glucocorticoïdes (267). L'expression de C/EBP β dans des fibroblastes est suffisante pour induire la différenciation en adipocyte de ces cellules, effet potentialisé par la co-expression du sous-type δ (260; 267). Dans un second temps, la C/EBP α entre en jeu pour induire la transcription de nombreux gènes spécifiques de l'adipocyte (268). Elle agit notamment sur les gènes des protéines impliquées dans l'accumulation lipidique et inhibe en parallèle la mitose des préadipocytes (269). Elle pourrait être un médiateur de l'arrêt de l'expansion clonale des préadipocytes, surtout que son induction entraîne l'expression de deux protéines inhibitrices de la prolifération : la protéine p21^{WAF1/CIP1} (*Cyclin dependent kinase Inhibitor Protein*) qui inhibe le cycle cellulaire, et la protéine GADD45 (*Growth*

Arrest and DNA Damage inducible protein) qui contribue à reformer les portions endommagées de l'ADN (270). Ainsi les dommages à l'ADN vont induire l'arrêt de la division et engendrer une réparation rapide des dommages.

➤ La famille des facteurs à motif hélice-boucle-hélice (HLH)

Les facteurs transcriptionnels à motif HLH participent au contrôle de la détermination, de la différenciation et de la multiplication cellulaire (271). ADD1/SREBP1 (*Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor1/Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*) est un facteur à motif HLH-leucine zipper dont l'expression est induite très tôt au cours de la différenciation induisant l'expression de certaines protéines impliquées dans l'adipogenèse (272). En effet, son expression dans les fibroblastes entraîne une induction de l'expression des gènes qui contrôlent le métabolisme et la synthèse des AG et l'activation de la LPL sans induire la différenciation adipocytaire. L'induction de l'adipogenèse peut survenir indirectement par l'augmentation de la production de ligand de PPAR γ 2 induite par ADD1/SREBP1 (273). À l'inverse, une invalidation du gène codant pour ADD1/SREBP1 dans des préadipocytes 3T3-L1 prévient la différenciation terminale (272).

À l'encontre de ces facteurs dits dominants positifs ou activateurs de la différenciation, il existe d'autres membres de la classe HLH agissant comme dominants négatifs en séquestrant les facteurs positifs par hétéro-dimérisation et en empêchant leur activité transactivatrice. Les Id (*Inhibitors of DNA binding*) font partie de cette catégorie de facteurs (274).

➤ La famille des PPAR

Les PPAR, récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des peroxysomes PPAR, font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires que je présenterai d'abord avant de parler plus spécifiquement de PPAR.

B. Les PPAR

1. Historique

Depuis toujours, le tissu adipeux est vu comme un tissu de stockage énergétique, mais de nos jours, il est considéré comme une glande endocrine en soi. Tout avait commencé avec la découverte des fibrates en 1962 par Thorp et Waring (275). Le clofibrate (chef de file) était le premier agent testé dans des études cliniques dans les

années 1970 pour traiter l'hyper-cholestérolémie et améliorer les dysfonctions cardiaques. Malheureusement lors d'un essai clinique, le World Health Organization Cooperative Primary Prevention Trial a montré un risque élevé de développement de cancer menant au décès sous ce traitement. Le clofibrate a été depuis retiré du marché. Cependant en 1987, les fibrates refont surface avec le Gemfibrozil®. La publication par l'Helsinki Heart Study de nouvelles études montrent une réduction de 34% des événements cardiaques majeurs chez les hommes d'âge moyen présentant une hyper-cholestérolémie sans atteinte cardiaque (276).

La découverte dans les années 1990 que les fibrates sont des ligands des PPAR α (277), récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique, l'inflammation et la fonction endothéliale (278), les ramènent sur le devant de la scène. La découverte de PPAR α stimula ainsi la recherche mondiale pour élucider son rôle dans la prolifération des peroxysomes dans l'hépatocarcinome (279-281). Plusieurs travaux ont ainsi décrit la structure de PPAR α , son profil d'activation et sa fonction en tant que facteur de transcription ligand dépendant (279; 282-290). Les éléments de réponse spécifique à la prolifération des peroxysomes (PPRE, *Peroxisome Proliferation Response Elements*) ont été ensuite décrits dans le promoteur des gènes microsomal et peroxysomal connus pour être surexprimés durant la prolifération des peroxysomes comme CYP4A1 (291), CYP4A6 (292) et l'acyl CoA oxidase (290). L'intérêt international pour l'étude des PPAR prit encore plus d'ampleur après l'identification et le clonage des 3 sous-types de PPAR (293-295).

PPAR α est un récepteur impliqué, non seulement dans la prolifération des peroxysomes dans les hépatocytes, mais aussi dans la médiation de l'effet hypolipidémique des fibrates. Cette évidence est basée sur le fait que PPAR α régule l'expression de différents gènes impliqués dans le transport et le stockage lipidiques (221; 289; 296-299). PPAR γ fut le premier récepteur nucléaire identifié comme médiateur de l'activité des antidiabétiques oraux les TZD et identifié comme un régulateur majeur de l'adipogenèse (221). Finalement, PPAR δ (aussi appelé PPAR β), forme ubiquitaire des PPAR, est principalement impliqué dans le métabolisme lipidique. Mais tout d'abord, voyons de plus près les récepteurs nucléaires en général dont les PPAR font partie.

2. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription activés par liaison d'un agoniste, souvent de nature lipidique, pour se lier à la région promotrice de certains gènes cibles et augmenter ou réprimer leur transcription en ARNm. Ces récepteurs sont soit présents dans le cytoplasme des cellules, migrant dans le noyau après leur activation, soit présents dans le noyau où ils seront activés.

Cette superfamille de protéines comprend environ 75 membres subdivisés en 6 groupes (300; 301). Parmi eux, nous pouvons citer les récepteurs des hormones stéroïdiennes regroupant les récepteurs aux androgènes, aux progestagènes, aux œstrogènes, aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes et les récepteurs des dérivés prostanoïques (prostacycline, leucotriène B4) et des AG polyinsaturés comme les PPAR. Cette famille regroupe également les récepteurs des rétinoïdes comme la vitamine A et l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR, *Retinoid X Receptor*).

a) **Structure et fonctions des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires se composent de 450 à 1000 acides aminés et leur structure est représentée par un enchaînement de 6 domaines communément annotés de A à F :

- Le domaine A/B de l'extrémité N-terminal du récepteur est de longueur et de structure primaire très variable d'un récepteur à l'autre. Il comprend le motif de transactivation (AF-1, *Activation Function-1*) qui lie les co-activateurs.
- Le domaine C de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) est caractérisé par un double repliement de sa chaîne protéique, maintenue par deux atomes de zinc interagissant avec 4 résidus cystéines. La liaison à l'ADN s'opère sur des séquences consensus (HRE, *Hormone Response Element*) précédant le gène cible à proximité du promoteur (302).
- Le domaine D est une zone charnière impliquée dans la liaison des protéines chaperonnes au récepteur et dans la liaison à l'ADN.
- Le domaine E, quant à lui, assure la liaison des médiateurs sur la partie C-terminale du récepteur. Le domaine de liaison du ligand (LBD, *Ligand Binding Domain*), assure également la dimérisation des récepteurs et comprend un second motif de transactivation AF-2.
- Le domaine F est une séquence protéique variable qui constitue la partie C-terminale de chaque récepteur.

3. **Mode d'action des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs des stéroïdes, en absence de ligand, forme un complexe avec des protéines chaperonnes qui se dissocie en présence de ligand pour permettre à l'agoniste de se fixer au récepteur. Ce dernier forme un dimère avec son homologue pour exercer son effet transcriptionnel au niveau de l'ADN. Les autres types de récepteurs nucléaires,

en l'absence de ligand, sont liés à leur site HRE de l'ADN avec une haute affinité. En présence de l'agoniste, l'activité transcriptionnelle du gène cible démarre.

Les co-activateurs des récepteurs nucléaires sont des protéines qui interagissent avec les sites AF-1 et AF-2 des extrémités N ou C-terminales du récepteur après la liaison de son ligand (302). À l'inverse, les co-répresseurs inhibent l'activité des récepteurs en l'absence de ligand en s'associant à l'ADN.

4. La famille des PPAR

Depuis leur identification en 1990, les PPAR suscitent un intérêt considérable et nos connaissances sur leurs rôles physiologiques ne cessent d'évoluer. Impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, l'homéostasie du glucose, la prolifération cellulaire et la différenciation, les PPAR sont une cible pharmacologique pour le traitement de désordres métaboliques tels que les dyslipidémies ou le diabète.

Les PPAR, membre de la superfamille des récepteurs nucléaires (303; 304), sont des facteurs de transcription activés par la liaison de certains AG ou de leurs métabolites lipidiques (303; 304). Consécutivement à la fixation de leurs ligands, les PPAR forment des hétérodimères avec les récepteurs RXR (280). Le complexe ainsi activé va se fixer sur les séquences PPRE typiques situées dans les régions promotrices des gènes cibles dont l'expression est alors stimulée. Ce processus de liaison des récepteurs aux PPRE correspond à la «trans-activation». Les PPRE ont été identifiés au niveau des régions promotrices de nombreux gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire, le transport membranaire des AG et la β -oxydation (305).

La famille des PPAR comprend trois membres, nommés α , β/δ et γ , chacun étant codé par un gène distinct. Si les séquences des domaines de liaison à l'ADN DBD sont conservées entre les 3 sous-types, celles des sites de liaison des ligands LDB le sont moins, signifiant que chaque sous-type est pharmacologiquement distinct des autres. Alors que PPAR α module la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, PPAR γ est plutôt impliqué dans la différenciation cellulaire, l'adipogénèse et l'insulino-résistance et PPAR δ dans le métabolisme lipidique et le cancer.

Le gène codant pour PPAR γ code pour 2 protéines, γ 1 et γ 2, issues de l'épissage différentiel de l'exon B (305; 306). Ainsi, le récepteur PPAR γ 2 possède 28 à 30 acides aminés de plus que son homologue γ 1 à son extrémité N-terminale chez la souris et chez l'homme. Cette séquence peptidique supplémentaire confère une activité transcriptionnelle 10 fois plus élevée pour PPAR γ 2 par rapport au sous-type 1 (307; 308).

Chez l'humain, deux nouveaux sous-types de PPAR γ ont été identifiés : PPAR γ 3 et PPAR γ 4 issues de deux promoteurs différents. Comme PPAR γ 2, l'expression de PPAR γ 4 semble être restreinte au tissu adipeux (309). Par ailleurs, l'ARNm de PPAR γ 3 a été détecté dans le tissu adipeux blanc, le gros intestin et les macrophages (310; 311).

a) Distribution tissulaire des PPAR

La distribution tissulaire et le niveau d'expression diffèrent selon l'isoforme considérée (312). PPAR α est exprimé essentiellement dans le foie, les reins, le cœur et les muscles, tissus où le catabolisme des AG est important. PPAR γ se retrouve principalement dans le tissu adipeux et le tractus gastro-intestinal (313). Alors que PPAR γ 1 est exprimé dans d'autres tissus, PPAR γ 2 constitue pour sa part, la forme des PPAR γ spécifique des adipocytes (313). Des études récentes ont néanmoins montré que le pancréas pourrait lui aussi exprimer ce sous-type (314; 315).

Les deux isoformes α et γ sont également exprimés dans les cellules de la paroi vasculaire : CE, CML et monocytes/macrophages (316). Alors que PPAR α est exprimé aussi bien dans les monocytes que les macrophages, l'expression de PPAR γ est surtout mise en évidence dans les macrophages (316). De plus, PPAR α et PPAR γ sont tous deux présents dans la plaque d'athérosclérose au niveau de la région sous-endothéliale et dans le noyau lipidique des lésions athérosclérotiques où ils co-localisent avec des marqueurs spécifiques des macrophages, des cellules musculaires lisses et des cellules spumeuses (311; 317; 318). Enfin, l'expression tissulaire de PPAR δ est ubiquitaire.

b) Les ligands des PPAR

Un large spectre de composés sont identifiés comme ligands des PPAR (319). Parmi les ligands naturels, tous les AG peuvent activer les PPAR, mais il existe toutefois certaines différences selon le récepteur. Ainsi, PPAR α présente une spécificité assez faible pour leur degré de saturation, alors que PPAR γ a une meilleure affinité pour les AG polyinsaturés. D'autres agonistes naturels de PPAR α et PPAR γ sont dérivés de l'acide arachidonique par les voies de la cyclo-oxygénase et de la lipo-oxygénase comme le leucotriène B4 (LTB4) et la 15-déoxy- Δ 12,14-prostaglandine J2 (PGJ2). Enfin, les AG oxydés dérivés des phospholipides des LDL oxydées (9- et 13-HODE) sont aussi des ligands naturels des PPAR. Quant aux principaux ligands synthétiques des PPAR, leurs noms sont bien connus dans le domaine médical. Il s'agit pour PPAR α , des fibrates, médicaments utilisés dans le traitement de l'hypertriglycéridémie et de l'hyperlipidémie mixte et, pour PPAR γ , des TZD qui sont utilisés dans le traitement du DT2 (cf. chapitre 2.5 sur les traitements du diabète). D'autres principes actifs comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens pourraient aussi être des agonistes des PPAR (317).

5. PPAR et le tissu adipeux

PPAR α et PPAR δ/β semblent avoir des influences adipogéniques limitées. Le PPAR α est exprimé de façon importante dans le tissu adipeux brun par rapport à son faible niveau d'expression dans le tissu adipeux blanc et dans les lignées préadipocytaires (320). L'invalidation du gène du PPAR α chez la souris a en revanche démontré que ce sous-type contribue à la régulation de la β -oxydation peroxysomale (321). Le PPAR δ/β , non spécifique du tissu adipeux et exprimé dans les préadipocytes, serait impliqué dans le contrôle de l'expression de certains gènes de la différenciation adipocytaire tel que celui de l'aP2 (322). Il est fortement induit au cours de la différenciation et est activé par les TZD et les AG saturés ou insaturés.

Dans le tissu adipeux, c'est le PPAR γ notamment le sous-type PPAR γ 2 qui joue un rôle central (323). En effet, cet isoforme participe à la fois aux processus d'adipogenèse, au maintien du métabolisme lipidique et aux fonctions endocrines de l'adipocyte mature (324).

a) Le rôle de PPAR γ dans l'adipogenèse

L'adipogenèse réfère au processus de différenciation des cellules précurseurs, pré-adipocytes, en adipocytes matures, durant lequel l'expression génique, la morphologie cellulaire et la sensibilité aux hormones et aux facteurs exogènes changent. Durant cette différenciation, l'expression de différents gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique est induite (cf. chapitre 3.1.4.3 sur les facteurs transcriptionnels de l'adipogenèse). Il est bien établi que PPAR γ est le plus important facteur de formation de l'adipocyte mature (323; 324) étant donné qu'il stimule l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques des adipocytes tels l'aP2 (325), la carboxykinase phosphoenolpyruvate (PEPCK, *PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase*) (326) et la lipoprotéine lipase (LPL, *LipoProtein Lipase*) (327). De plus, l'expression ectopique de PPAR γ est suffisante pour induire la métamorphose des fibroblastes en adipocytes (323). D'autre part, les adipocytes de souris adultes déficientes pour PPAR γ meurent en quelques jours (328) et les souris invalidées du gène PPAR γ sont incapables de développer du tissu adipeux (329; 330). Ces résultats expliquent la lipodystrophie observée chez certains humains présentant des mutations de leur gène PPAR γ (331-335).

D'autre part, il est connu que l'hyperlipidémie augmente l'activité adipogénique de PPAR γ 2 (336) avec pour conséquence de perturber les sécrétions adipocytaires incluant une augmentation de la production de TNF- α (337). Ce dernier peut jouer un rôle autocrine sur le tissu adipeux pour diminuer le stockage des lipides en inhibant l'adipogenèse comme il a été démontré *in vitro* (338). De plus, TNF- α est impliqué dans

les processus d'insulino-résistance en déphosphorylant les récepteurs de l'insuline (339), ce qui mène aussi à un rétrocontrôle négatif sur le processus adipogénique.

Finalement, en parallèle de son activité adipogénique, PPAR γ induit l'apoptose des adipocytes matures dans un processus de régénérescence du tissu gras. En effet, il a été démontré qu'un traitement des adipocytes matures avec les TZD augmente l'apoptose de ces cellules de 2,5 fois (340). C'est ainsi que PPAR γ régule l'équilibre dans le tissu adipeux entre les nouvelles cellules adipeuses, plus sensibles à l'insuline et au stockage de lipides, et les adipocytes matures avec des vacuoles saturées de lipides et très peu sensibles à l'insuline.

6. Les adipokines

Le terme « adipokine » ou adipocytokine regroupe toute protéine sécrétée et synthétisée par le tissu adipeux. Bien qu'elles portent toutes le nom générique d'adipokine, certaines d'entre elles sont synthétisées principalement par les cellules adipeuses comme la leptine et l'adiponectine alors que les cytokines telles que le TNF α et l'IL-6 sont essentiellement sécrétées par les cellules qui constituent la fraction stromovasculaire. Cette dernière se compose de nombreux types cellulaires tels les préadipocytes, les CE et les macrophages.

a) La leptine

La découverte de la leptine en 1994 a contribué énormément dans la compréhension de la régulation de la balance énergétique et de la biologie du tissu adipeux (341). La leptine est une adipokine sécrétée exclusivement par les adipocytes matures du tissu adipeux et son taux plasmatique est positivement corrélé à la masse adipeuse corporelle. Les sécrétions de leptine sont ainsi augmentées chez les obèses et diminuées chez les individus maigres (342; 343). Elle agit sur la satiété au niveau du système nerveux sympathique (342; 344) et est associée à la résistance à l'insuline et à l'inflammation observées chez les obèses (345-347). De plus, cette hormone est liée à la croissance de plusieurs types cellulaires: hématopoïétique (348), leucocytaire (349), pancréatique (350), hépatique (351) et neuronal (352).

Le récepteur de la leptine, Ob-R, appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe I (353) qui inclut les récepteurs de certaines interleukines (IL-2 à IL-7), les récepteurs de l'hormone de croissance (GH, *Growth Hormone*), les récepteurs de la prolactine et ceux des érythropoïétines. Ceci suggère d'autres effets biologiques périphériques possibles de la leptine, comme l'inflammation, associés à sa nature apparentée aux cytokines. Des expériences *in vitro* ont démontré que la leptine

augmenterait la production de TNF α et activerait les macrophages (354; 355). En outre, la leptine stimule la synthèse d'ET-1 (356), de la NOS (357), la production de ROS et l'expression de MCP-1 (358) ce qui a pour impact d'augmenter le stress oxydant des CE (359).

La leptine possède une activité angiogénique et promeut la migration et la prolifération des CML (360; 361). Cet effet est essentiel dans le processus physiologique de l'expansion du tissu adipeux qui nécessite une bonne irrigation sanguine. Par ailleurs, la leptine favorise l'oxydation des AG, la capture du glucose, l'agrégation plaquettaire et l'accumulation du cholestérol dans les macrophages, effet impliqué dans l'athérogénèse (362).

Même si ses voies de signalisation restent encore mal définies, il est cependant bien établi que la leptine active la protéine kinase 5'-AMP (AMPK ; *AMP-activated protein kinase*) dans ces tissus (188; 363). L'AMPK stimule ainsi l'oxydation des AG dans le muscle en inhibant l'activité de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC) ; enzyme gouvernant la production du malonyl-CoA responsable de la lipogenèse. C'est ainsi que la leptine empêche l'accumulation de lipides dans les tissus périphériques pour prévenir la lipotoxicité (347). Une activation plus tardive de l'AMPK passe par l'effet de la leptine via le système nerveux sympathique.

b) L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine insulino-sensibilisante dont le gène fut découvert un an après la découverte de la leptine (364). À l'inverse de la leptine, ses concentrations plasmatiques diminuent avec la prise de poids et l'obésité chez les diabétiques insulino-résistants, les hypertendus et en présence de maladies coronariennes (365-367). Ses propriétés protectrices contre l'athérosclérose passent par ses effets inhibiteurs sur l'expression des molécules d'adhésion des EC qui limitent le recrutement des monocytes à la paroi vasculaire, et par ses propriétés anti-inflammatoires qui inhibe la production du TNF α et l'activité des macrophages (368; 369). Finalement, cette adipokine inhibe la prolifération des CML en inhibant les effets prolifératifs du PDGF (370-372).

Le mode d'action de l'adiponectine sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la régulation de l'oxydation des AG passe par l'activation de la 5'-AMPK (187; 373). De ce fait, une diminution des TGA musculaires et hépatiques peut contribuer à améliorer la transduction du signal de l'insuline. L'adiponectine augmente aussi la translocation des transporteurs GLUT4 du cytoplasme vers la membrane plasmique et facilite ainsi la captation de glucose par les tissus. L'adiponectine améliore aussi la glycémie en inhibant l'expression des ARNm codants pour la PEPCK et la G6Pase hépatique, ce qui a pour effet de réduire la production du glucose (187).

c) **Autres adipokines en quelques lignes**

➤ Apeline

L'apeline est une adipokine sécrétée par le tissu adipeux dont la sécrétion est gouvernée par l'insuline et le TNF α (374; 375). Son récepteur est exprimé dans de nombreux tissus (cœur, intestin, muscles, etc.) et au niveau du système nerveux central (376; 377), ce qui lui permet de contrôler la prise alimentaire et hydrique, d'améliorer le transport glucidique au niveau périphérique et d'inhiber la sécrétion pancréatique d'insuline (378-381). L'apeline contrôle aussi la pression artérielle et l'activité cardiaque du fait de son action directe sur le système cardiovasculaire et de son action au niveau du système nerveux autonome (382; 383).

➤ ASP (*Acylation Stimulating Protein*)

Sécrétée après un repas, cette adipokine lipogénique stimule le stockage des lipides, la capture du glucose et l'estérification des AG en synergie avec l'insuline via son récepteur C5L2 (384). Le taux plasmatique de cette adipokine est augmentée chez les diabétiques de type 2, ceci étant fort probablement lié à l'augmentation de la charge pondérale chez ces patients (385).

➤ Cathepsines

Les cathepsines sont des protéases de la famille de la papaïne activement impliquées dans le métabolisme des protéines (386; 387). Cette famille comprend différents membres dont les cathepsines S, K et L. Elles sont sécrétées par le tissu adipeux lors de la prise alimentaire parallèlement à la leptine et agissent directement sur la différenciation des adipocytes et le remodelage de la MEC (388). Cette action de remodelage matriciel (dégradation du collagène, de l'élastine, de la fibronectine, etc.) est essentielle pour l'adipogenèse (389; 390). Leur expression est augmentée chez les personnes obèses (391).

La cathepsine L, pour sa part, joue un rôle fondamental dans la tolérance glucidique en stimulant la capture du glucose et le recyclage des IR.

➤ FIAF (*Fasting Induced Adipose Factor*)

La FIAF est une adipokine dont l'expression est augmentée durant le jeûne (392). Son gène codant contient une séquence PPRE et son expression est, de ce fait, contrôlée par les PPAR (393-395). Cette hormone joue un rôle essentiel dans l'homéostasie glucidique, en améliorant la sensibilité systémique à l'insuline, et dans le métabolisme lipidique, en stimulant la capture hépatique des AG et en inhibant la LPL (396).

➤ Omentine

L'omentine est une adipokine sécrétée notamment par le tissu adipeux viscéral (397). Elle possède une action de potentialisation de l'insulino-sensibilité via l'activation de l'Akt (397). Sa concentration plasmatique est plus importante chez les femmes que chez les hommes mais elle est diminuée chez les obèses (398).

➤ Rbp-4 (*Retinol Binding Protein-4*)

La Rbp-4 est une adipokine insulino-désensibilisante dont l'expression adipocytaire et les taux plasmatiques sont augmentés chez les diabétiques insulino-résistants (399). Son action passe par l'inhibition de la phosphorylation de l'IRS-1 et de la PI3K. Ceci mène à une altération de la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle (400). Du reste, cette adipokine augmente la production hépatique de glucose en inhibant la synthèse du PEPCK (399).

➤ Résistine

Elle fut découverte dans le tissu adipeux blanc de la souris (401). Son taux circulant est augmenté avec l'obésité au sein de laquelle elle induit une résistance à l'insuline ainsi qu'une intolérance au glucose (402). Elle est, de ce fait, soupçonnée d'être impliquée dans la pathogenèse du DT2 lié à l'obésité chez la souris (403).

Toutefois, la résistine est très faiblement exprimée par le tissu adipeux chez l'homme et les faibles quantités retrouvées dans le tissu adipeux proviendraient des macrophages qui la transportent de la moelle osseuse (404-406). Les taux plasmatiques de la résistine sont indépendants de l'obésité et des altérations métaboliques et de ce fait, celle-ci n'est pas considérée comme une vraie adipokine chez l'humain (407).

➤ Vaspine

La vaspine est une adipokine exclusive du tissu adipeux appartenant à la superfamille des inhibiteurs de sérine protéase (408). Son expression tissulaire et plasmatique est augmentée chez les obèses afin d'améliorer l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance mais diminue avec la progression du diabète (408). Chez l'humain, ses taux plasmatiques sont deux fois plus élevés chez les femmes que chez les hommes (409).

➤ Visfatine

La visfatine est une protéine pro-proliférative dont le gène fut découvert récemment (410). La visfatine est caractérisée par des effets insulino-mimétiques qui se lie aux IR avec la même affinité que l'insuline pour stimuler le transport du glucose et la lipogenèse (410). De ce fait, ses concentrations plasmatiques sont augmentées chez les obèses pour

contrecarrer le développement de leur résistance à l'insuline (410). Cependant, les effets de la visfatine sont de plus en plus controversés avec des modèles animaux de diabète et d'obésité qui ne modulent pas le taux de cette adipokine (411).

7. PPAR et contrôle de l'inflammation

Le rôle des PPAR ne se limite pas à leurs effets sur le métabolisme. Par des stimuli endogènes et pharmacologiques, les PPAR modulent aussi la réponse inflammatoire. La réaction inflammatoire, un programme thérapeutique de l'organisme en réponse à un stimulus exogène (traumatisme, infection, etc.), se produit en trois étapes :

1. L'hyperhémie correspondant à une augmentation du débit sanguin au site atteint.
2. L'augmentation de la perméabilité vasculaire.
3. La diapédèse leucocytaire et l'accumulation de leucocytes au niveau de la lésion.

L'effet anti-inflammatoire des PPAR passe en premier lieu par l'activation de PPAR α qui diminue les concentrations circulantes de TGA et augmente celles du HDL (412). Ces effets ont été découverts grâce aux fibrates qui inhibent également la sécrétion d'IL-6 (413; 414).

PPAR γ exerce aussi une action anti-inflammatoire directe, rôle passant par l'effet antagoniste de PPAR γ sur la sécrétion de TNF α et de certaines interleukines (340; 415; 416). PPAR γ inhibe ainsi la relâche du glycérol et des AG induite par ces cytokines (417). D'autre part, les ligands des PPAR γ induisent l'expression de récepteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol, son transport hépatique et sa dégradation (318). Par ailleurs, il est bien établi que PPAR γ est activé durant la différenciation des monocytes en macrophages (316). Cependant, son rôle fait l'objet de beaucoup de controverse même si son expression est augmentée dans les macrophages activés et au sein de la lésion athérosclérotique et des cellules spumeuses (318; 418). Les ligands de PPAR γ sont aussi connus pour leurs effets inhibiteurs sur l'expression de la iNOS et de la MMP-9 et sur l'expression de VCAM-1, MCP-1 et ET-1 par les CE (418-420).

Une combinaison de traitements avec des agonistes PPAR α/γ diminue l'épaisseur de l'intima et de la média des artères et le processus inflammatoire athérogénique (421-423).

8. PPAR γ et l'athérosclérose

L'hypercholestérolémie et les dyslipidémies en général sont reconnues comme ayant un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. Les fibrates diminuent les concentrations circulantes de TGA en stimulant l'entrée des AG dans les mitochondries et, en activant la LPL, augmentent leur lipolyse intravasculaire (412). De plus, ces molécules augmentent la synthèse des apolipoprotéines qui elles aussi augmentent les concentrations plasmatiques des HDL.

Les agonistes de PPAR γ , notamment les TZD, diminuent aussi les concentrations plasmatiques de TGA, du LDL et des AG circulant et augmentent celles du HDL (424). Ainsi les TZD possèdent des effets antiathéromateux et les diabétiques traités avec cette classe thérapeutique pourraient présenter moins de risque de formation de plaques d'athéromes (423; 425; 426).

D'autre part, PPAR γ inhibe la prolifération et la migration des CML des vaisseaux sanguins et la production de cytokines inflammatoires par les macrophages, et prévient ainsi la formation de la plaque athéromateuse (427-431).

Ces études insistent sur l'effet direct des agonistes de PPAR γ sur les CML et les macrophages dans l'athérosclérose. Or ces agonistes se lient sur le domaine de fixation des ligands des PPAR γ qui est identique dans les deux sous-types, donc ces effets seraient non spécifiques. Étant donné que PPAR γ 2 possède une activité transcriptionnelle plus importante que PPAR γ 1 et qu'il est exclusivement exprimé dans le tissu adipeux, il pourrait être important de préciser le rôle de ce tissu et de PPAR γ 2 dans l'athérosclérose.

9. Contrôle des PPAR par les hormones sexuelles

Le profil de distribution de la masse grasse chez l'humain, et d'une façon plus générale chez les mammifères, est sexuellement déterminée (432). En général, il est accepté que les femmes possèdent une plus grande quantité de tissu adipeux (total et en pourcentage). Par contre, les hommes ont tendance à posséder une plus grande quantité de tissu adipeux viscéral (433-435). De plus, la topographie du tissu gras est différente entre les deux sexes (cf. 3.1.1.3 sur l'obésité).

En effet, des souris, mâles et femelles, invalidées de leur gène codant pour le récepteur alpha aux œstrogènes (ER α , *Estrogen Receptor alpha*) présentent une augmentation de leur masse grasse (436). L'œstrogène pourrait aussi réduire l'hyperplasie et l'hypertrophie des adipocytes chez les mâles (437). Les évidences du rôle des œstrogènes dans la formation du tissu adipeux s'accumulent et l'effet ne serait pas

exclusif à la femelle. Néanmoins, le mécanisme de contrôle de l'œstrogène sur l'adipogenèse ne fut éclairci que récemment. Les estrogènes seraient responsables de l'augmentation du ligand de PPAR γ et induiraient ainsi un effet adipogénique (438). Cependant, certaines études mettent en évidence les effets de ER α dans la modulation de ce processus (439; 440). En effet, ER α pourrait jouer un rôle important dans la différenciation adipocytaire en modulant l'expression de différents gènes notamment celui de PPAR. ER α pourrait ainsi réguler l'expression de différentes protéines adipogéniques comme l'aP2 via PPAR γ (439). De plus, certaines évidences suggèrent que les agonistes de PPAR γ pourraient interférer avec les effets de l'œstrogène (441). Finalement, les ER β (*Estrogen Receptor beta*) seraient eux aussi négativement modulés par PPAR γ (442).

Par ailleurs, les androgènes ont aussi leurs effets sur PPAR γ . L'obésité abdominale est associée avec un taux de testostérone abaissé dans le sang d'individus mâles obèses (443-445). De plus, la présence de récepteurs aux androgènes dans le tissu adipeux est connu depuis longtemps (446) et un traitement aux androgènes diminue la masse adipeuse en inhibant l'adipogenèse (447). Ces effets dose-dépendants demeurent surtout significatifs à des doses physiologiques (448). En effet, un traitement à dose supra-physiologique d'androgène induit plutôt une augmentation de la masse adipeuse (449).

Certains travaux étudiant l'effet inhibiteur des androgènes sur l'adipogenèse ont démontré que cet effet passe par l'inhibition de l'expression du PPAR γ 2 adipocytaire (450). Les androgènes, comme la testostérone, inhibent la différenciation adipocytaire en agissant sur les récepteurs spécifiques de ce processus soit PPAR γ (451). De plus, ces hormones sont plutôt lipolytiques et diminuent la prolifération et la différenciation des préadipocytes (452-454).

Toutefois, il y a beaucoup à approfondir sur les mécanismes complexes impliqués dans la distribution sexe-dépendante du tissu adipeux et les hormones sexuelles y participent probablement de façon significative par leurs actions directes sur l'adipogenèse (via PPAR γ) ou indirectes par la modulation d'autres processus physiologiques influençant le tissu gras.

Chapitre II. PROBLÉMATIQUE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Lors de la caractérisation de l'effet de l'obésité et du diabète sur le développement de l'athérosclérose, les chercheurs se sont généralement limités à évaluer la contribution métabolique systémique du tissu adipeux et son rôle dans le processus athérogénique. Cependant, le rôle des adipocytes matures dans le processus de développement du diabète est maintenant reconnu. En effet, le développement de techniques d'extraction des cellules adipeuses et la mise en place d'une lignée cellulaire capable de se transformer en adipocytes matures, les préadipocytes 3T3-L1, a permis de mieux caractériser et de quantifier leurs effets plus particulièrement au niveau métabolique et systémique (455). De plus, au cours des dernières années, la découverte d'interactions entre les adipocytes, le métabolisme général et les altérations de la fonction vasculaire a suscité de multiples recherches sur les récepteurs nucléaires présents dans les adipocytes et leurs contributions au métabolisme systémique et aux altérations cardiovasculaires (456; 457).

Plusieurs polymorphismes ont été décrits dans la séquence codante du gène de PPAR γ , un des récepteurs nucléaires les plus étudiés dans ce domaine. Les mutants négatifs de PPAR γ , tels le L466A, le P467L et le V290M, ont été associés au DT2 sévère, à l'hypertension et à une lipodystrophie (332; 458; 459). Par ailleurs, le mutant le plus répandu Pro12Ala est spécifique de la forme PPAR γ 2 puisqu'il touche un des 30 premiers acides aminés de la protéine qui n'existe pas dans PPAR γ 1 (460). L'effet de cette mutation sur la structure tridimensionnelle de PPAR γ 2 n'est pas encore déterminé, mais résulte en une diminution de l'affinité du récepteur pour PPRE de 50% qui conduit à une réduction de son activité transcriptionnelle rendant ce variant hypo-actif (461; 462). La raison de cette faible activité ne réside pas dans une différence d'affinité pour son ligand mais provient d'une fixation moindre à l'ADN. Dans des études épidémiologiques récentes, Pro12Ala était associé à une protection contre le développement du DT2 (463), à une diminution d'événements cardiovasculaires (464; 465) et à une diminution de l'accumulation lipidique (466).

L'hypothèse générale de mes travaux est qu'un apport lipidique influence la fonction endocrine du tissu adipeux via son récepteur nucléaire spécifique PPAR γ 2 dépendement de la nature animale ou végétale de la diète et indépendamment du cholestérol. La modulation de la fonction adipocytaire affecte le profil de sécrétion des adipokines et altère ainsi l'homéostasie corporelle en induisant des altérations métaboliques et cardiovasculaires liées à l'obésité. Ces effets pourraient être différents selon le sexe des souris de notre modèle animal.

L'objectif principal de ce projet de recherche était donc, dans un premier temps, de développer et caractériser un modèle d'altérations métaboliques lié à un apport lipidique menant à l'obésité et au DT2. L'utilisation de diètes de même composition lipidiques mais de natures différentes fut le point fort de ce travail pour l'étude de la fonction adipocytaire différentielle. Dans un second temps, nous avons procédé à l'étude de la contribution des adipocytes matures aux dommages vasculaires initiés par les altérations des CML.

Nous avons procédé par une approche méthodique allant d'un modèle animal vers la cellule. Nous avons combiné des études *in vivo* chez la souris avec des techniques cellulaires *in vitro* avec des adipocytes de souris diabétiques/obèses ou saines pour étudier les interactions entre le système vasculaire et le système adipeux dans des conditions physiopathologiques spécifiques.

Chapitre III. CONTRIBUTIONS ORIGINALES

IV. Nature of Fatty Acids in High Fat Diets Differentially Delineates Obesity-Linked Metabolic Syndrome Components in Male and Female C57BL/6J Mice

Diabetology & Metabolic Syndrome 2011, **3**:34doi:10.1186/1758-5996-3-34

Souhad El Akoum, Vikie Lamontagne, Isabelle Cloutier and Jean-François Tanguay

ISSN: 1758-5996

Article type: Research

Submission date: 8 July 2011

Acceptance date: 14 December 2011

Publication date: 14 December 2011

A. Abstract

Background: Adverse effects of high-fat diets (HFD) on metabolic homeostasis are linked to adipose tissue dysfunction. The goal of this study was to examine the effect of the HFD nature on adipose tissue activity, metabolic disturbances and glucose homeostasis alterations in male mice compared with female mice.

Methods: C57BL/6J mice were fed either a chow diet or HFD including vegetal (VD) or animal (AD) fat. Body weight, plasmatic parameters and adipose tissue mRNA expression levels of key genes were evaluated after 20 weeks of HFD feeding.

Results: HFD-fed mice were significantly heavier than control at the end of the protocol. Greater abdominal visceral fat accumulation was observed in mice fed with AD compared to those fed a chow diet or VD. Correlated with weight gain, leptin levels in systemic circulation were increased in HFD-fed mice in both sexes with a significant higher level in AD group compared to VD group. Circulating adiponectin levels as well as adipose tissue mRNA expression levels were significantly decreased in HFD-fed male mice. Although its plasma levels remained unchanged in females, adiponectin mRNA levels were significantly reduced in adipose tissue of both HFD-fed groups with a more marked decrease in AD group compared to VD group. Only HFD-fed male mice were diabetic with increased fasting glycaemia. On the other hand, insulin levels were only increased in AD-fed group in both sexes associated with increased resistin levels. VD did not induce any apparent metabolic alteration in females despite the increased weight gain. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma-2 (PPAR γ 2) and estrogen receptor alpha (ER α) mRNA expression levels in adipose tissue were decreased up to 70% in HFD-fed mice but were more markedly reduced in male mice as compared with female mice.

Conclusions: The nature of dietary fat determines the extent of metabolic alterations reflected in adipocytes through modifications in the pattern of adipokines secretion and modulation of key genes mRNA expression. Compared with males, female mice demonstrate higher capacity in controlling glucose homeostasis in response to 20 weeks HFD feeding. Our data suggest gender specific interactions between the diet's fatty acid source, the adipocyte-secreted proteins and metabolic disorders

Keywords: Adipocyte, Adipokines, Diabetes, High Fat Diet, Metabolic disorders, Obesity, Type 2 Diabetes.

B. Introduction

Obesity is defined as an increase of adipose tissue mass in the body and its accumulation in peripheral organs that leads to metabolic abnormalities such as type 2 diabetes (T2D), insulin resistance and hyperlepidemia [1, 2]. Obesity is thus a worldwide healthcare problem increasing morbid-mortality [2].

The visceral adipose tissue plays an important role in the regulation of postprandial lipid and glucose systemic homeostasis by targeting essential organs (adipose tissue, muscle, etc.) and systems (neuroendocrine axis, etc.) [3-6]. It is considered as a secretory gland source of several bioactive peptides called adipokines [6]. Thus, adipose tissue becomes a major protagonist of metabolic alterations triggered by lipid over-accumulation in their cytoplasmic droplet which leads to adipocytes function disorders [7, 8]. An alteration in the adipokine secretion profile leads to insulin resistance, glucose intolerance and lipid metabolic disturbances [8-10].

Consumption of High-fat diets (HFD) is a central risk factor for metabolic disorders linked to obesity [9, 11]. Adverse effects of HFD on metabolic homeostasis are linked to adipose tissue physiology and are highly influenced by gender [12, 13]. The imbalance between caloric intake and energy expenditure leads to hyperplasia and hypertrophy of adipocytes depending on the type as much as the amount of dietary lipids [14, 15].

Numerous factors regulate the adipose tissue activity including adipocyte-specific genes such as peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) [16]. Dietary fatty acids (FA) and their derivatives are described as PPAR γ ligands that trigger physiological responses such as adipogenesis and adipokine secretion. Thus, HFD-inducing metabolic disorders act via PPAR γ to induce different levels of systemic homeostatic remodelling.

Appreciating the pathogenesis of HFD-induced metabolic disorders requires a thorough knowledge of adipose tissue physiology and the regulation of adipokines secretion and action including the role of gender in response to these parameters.

Thus, significant progress has been made in our understanding of the relation between HFD feeding and adipose tissue dysfunction. However, experimental evidence for HFD-mediating metabolic alterations remains to be elucidated. Therefore, we propose a possible role for HFDs' fat nature on the establishment of metabolic disorders. Herein, we evaluated the impact of FA nature on the development of metabolic alterations through modulation of adipose tissue activity and secretion profiles. We also determined gender-specific impact on the kinetic of metabolic disorders progression in response to these diets.

C. Research Design and Methods

1. Experimental protocol

The animal protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the Montreal Heart Institute conforming to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Three groups of 10 male and 10 female C57BL/6J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MN, USA) were included in this study at 5 weeks of age. Each group was fed either standard diet (SD) used as control (6% fat, 57% sucrose) or one of the two low cholesterol HFD (34.9% fat, 26.3% sucrose) (detailed composition presented in Table 4-1). These latter were iso-caloric but differed in fat nature: VD was composed of soy and cotton oil while AD was composed of lard. Weight gain was monitored during the 20 weeks of protocol and daily food consumption was calculated by subtracting the residual quantity from the supplemented food quantity each day. Energy intake was calculated on the basis of 3.8 kcal/g for the SD and 5.2 kcal/g for both HFD.

2. Intra-Peritoneal glucose tolerance test

The Intra-Peritoneal Glucose Tolerance Test (IPGTT) was performed after 20 weeks of diet following overnight (18hr) fasting. After measuring the fasting glycaemia using an Accu-Check® (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) glucometer, mice received an intra-peritoneal injection of glucose solution (2g/kg). Subsequent measures of plasma glucose levels were performed 30, 60, 90, 120 and 180 minutes post-injection. The area under the glucose tolerance curve (AUC) was measured to evaluate mice glucose tolerance.

3. Physiological analyses

Non-invasive measurement of mice cardiac function was performed by Doppler echocardiography under anesthesia (isoflurane 2.5%). The velocities of the early mitral flow (E) over the late mitral flow (A) were measured with a Doppler Signal Processing Workstation (GE-Ultrasound System). An increase in the E/A ratio, with restrictive aspect of transmitral flow ($E/A > 2$) indicated a diastolic dysfunction with increased LV filling pressure. To calculate ventricular mass, left ventricular (LV) tele-diastolic diameter, posterior wall and inter-ventricular septum thickness were measured.

4. Biochemical analyses

At sacrifice, after an overnight fast (18hr), blood samples were gathered by cardiac exsanguinations and plasma was collected and stored at -20°C until analysis. Plasma adiponectin and leptin concentrations were measured using mouse ELISA kits (ALPCO, Salem, NH, USA) according to the manufacturer's instructions. Plasma insulin, resistin and $\text{TNF}\alpha$ levels were analyzed using mouse ELISA kits (AssayPro, St. Charles, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. All measurements were analyzed in duplicate for at least 8 animals per group. The circulating concentrations of FA in mice serum were evaluated using ADIFAB free FA indicator (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

5. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)

Insulin resistance was assessed by calculation of HOMA-IR using glucose and insulin concentrations obtained after overnight fasting (18hr), using the following formula:

$$\text{HOMA-IR (mmol/L} \times \mu\text{U/ml)} = \text{fasting glucose (mM)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) / 22.5$$

HOMA-IR is known to be correlated with the insulin sensitivity evaluated by the euglycemic hyperinsulinemic clamp [17, 18].

6. Quantitative real-time PCR (Q-PCR).

At sacrifice, mouse adipose tissue was removed from the abdominal visceral region weighted to evaluate its accumulation level, and then frozen until mRNA extraction. Total RNA was isolated from approximately 30 mg of frozen white adipose tissue of the abdominal visceral region using Qiazol reagent according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Toronto, ON, Canada). Single-strand cDNA was synthesized according to the procedure in the iScript cDNA Synthesis Kit manual (Bio-Rad Laboratories, Montreal, QC, Canada). Q-PCR reactions were carried out using the Brilliant-II SYBR[®] Green Master-Mix (Stratagene, Mississauga, ON, Canada) and specific primers:

- Adiponectin primers (#GenBank: NM_009605.4):
 - Fwd 5'-GAA-TCA-TTA-TGA-CGG-CAG-CA-3'
 - Rev 5'-TCA-TGT-ACA-CCG-TGA-TGT-GGT-A-3'
- Leptin primers (#GenBank: NM_008493.3):

- Fwd 5'-GAC-ATT-TCA-CAC-AGG-CAG-TCG-3'
- Rev 5'-GCA-AGC-TGG-TGA-GGA-TCT-GT-3'
- TNF α primers (#GenBank: NM_013693.2):
 - Fwd 5'-CAT-CTT-CTC-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-A-3'
 - Rev 5'-TGG-GAG-TAG-ACA-AGG-TAC-AAC-CC-3'
- PPAR γ 2 primers (#GenBank: NM_011146.3):
 - Fwd 5'-AGC-ATG-GTG-CCT-TCG-CTG-AT-3'
 - Rev 5'-GGT-GGA-GAT-GCA-GGT-TCT-AC-3'
- ER α primers (#GenBank: NM_007956.4):
 - Fwd 5'-TCT-GAC-AAT-CGA-CGC-CAG-AA-3'
 - Rev 5'-TAA-CAC-TTG-CGC-AGC-CGA-CA-3'

The mRNA levels were normalized to Cyclophilin-A expression level (Fwd 5'-CCG-ATG-ACG-AGC-CCT-TGG-3'; Rev 5'-GCC-GCC-AGT-GCC-ATT-ATG-3'). The targeted and reference genes were amplified in duplicate in the same run using the Mx3000P Q-PCR System (Stratagene).

The relative quantification of target genes was determined using the MxProTM Q-PCR software version 3.00 (Stratagene). Briefly, Ct average of each duplicate was calculated for each gene and Cyclophilin A and the Δ CT (CT_{gene} – CT_{Cyclo-A}) was determined. The control adipose tissue sample was chosen as reference sample and seted as 100% of gene quantity. Finally, the mRNA abundance of other samples to the mRNA abundance of the control adipose tissue was calculated with use of the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

7. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed separately for males and females.

Data are presented as mean \pm standard deviation for continuous variables. Repeated measures analysis of covariance (ANCOVA) model was used to study weight gain across the study time and between groups (SD, VD and AD groups) adjusted for baseline weight value. The group x time interaction was also included in the ANCOVA

model and comparisons between groups at a given time point were undertaken only in the presence of a significant group x time interaction. Otherwise, global conclusions were drawn based on the main time and group effects of the model.

Repeated measures analysis of variance (ANOVA) models were used to study the glycemic parameters across the IPGTT time (0, 30, 60, 90, 120 and 180 min) and between groups. Models with time, group and group x time interaction as independent variables were used. Comparisons between groups at a given time-point were undertaken only in the presence of significant group x time interaction. Otherwise, global conclusions were drawn based on the main time and group effects of the model.

The insulin, adiponectin, leptin, TNF α and FA levels were compared between groups (SD, VD and AD groups) using an ANOVA model.

In addition, the relationships among weight gain, cardiac parameters and metabolic parameters were investigated using Pearson or Spearman correlations according to the nature of the data distribution.

All analyses were done using SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and conducted at the 0.05 significance level.

D. Results

1. Weight gain and adipose tissue development

After 20 weeks of diet, the mean weight in SD group had increased by 64% in males compared to their weight at the beginning of the protocol (Figure 4-1.A). A more pronounced increase was observed in VD (150%, $P < 0.001$) and AD groups (144%, $P < 0.001$). Comparable results were obtained in females fed with VD (116%) and AD (137%) compared to the SD group (39%, $P < 0.001$) (Figure 4-1.B). Despite the differences in weight gain, the daily food intake (kCal/day/mouse) was similar in both sexes notwithstanding the different diets (Figure 4-1.C).

However, the weight gain observed in HFD groups did not reflect comparable amounts of adipose tissue accumulation in the abdominal visceral region (Figure 4-1.D). We showed that male and female mice under SD accumulated 3.9 g and 2.3 g respectively after 20 weeks of diet. For the same feeding time, considerable increase was seen in adipose tissue mass in male and female mice under VD (8.4 g and 4.9 g respectively) and AD (15.2 g and 11.2 g respectively) compared to SD group ($P < 0.01$). In the HFD group, for a similar weight gain, abdominal-visceral adipose tissue

constituted 37.4% of total body weight in male mice under AD; a 2-fold increase as compared to the VD group (17.8%, $P < 0.001$) and a 3-fold increase in comparison with the SD group (12.9%, $P < 0.001$). Similar results were obtained in females (10.6% for SD group; 14.0% for VD group; 26.0% for AD group) ($P < 0.001$).

2. Glycemic parameters

The IPGTT showed a glycaemia peak 30 min post-challenge in the SD male group (Figure 4-2.A). Glucose elimination followed first order kinetic curve thereafter to reach basal level after 180 minutes. Both HFD groups showed an equivalent glucose elimination kinetic curve with higher blood glucose levels throughout the duration of the test. This led to an increased AUC in these groups (45.5 for VD, 44.6 for AD) compared to SD (28.6, $P < 0.001$) (Figure 4-2.C). In contrast to male groups, female groups responded such that only AD showed an increased glycaemia 30 min post-challenge (Figure 4-2.B) with slight glucose intolerance reflected by an increased AUC (41.0) compared to SD (36.3, $P < 0.01$) (Figure 4-2.C). AUC of the VD female group remained unchanged (39.4).

Both HFD male groups had an increased fasting glycaemia (Figure 4-2.D) and are therefore considered diabetic in addition to being glucose intolerant. In contrast no change in fasting glycaemia was observed in the female groups.

3. Biochemical blood analysis

Insulin concentration was significantly increased in AD male (0.67 μ g/ml) and female (0.72 μ g/ml) groups compared to SD group (0.33 μ g/ml for male, $P < 0.01$; 0.40 μ g/ml for female, $P < 0.01$), and VD group (0.40 μ g/ml for male, $P < 0.05$; 0.25 μ g/ml for female, ($P < 0.001$) (Figure 4-3.A). These results emphasize the T2D state of AD male mice shown to have developed glucose intolerance and increased fasting glycaemia. Furthermore, the HOMA-IR factor, reflecting the insulin resistance, was also significantly increased in the AD group (Figure 4-3.B).

Circulating FA levels were highly increased in HFD groups for both genders ($P < 0.01$) (Figure 4-3.C). HFD raised circulating FA by 130% in males (1.13 μ M for VD, 1.18 μ M for AD) and up to 200% in females (0.97 μ M for VD, 1.15 μ M for AD) compared to their respective control (0.50 μ M for male, 0.38 μ M for female), without significant differences between HFD groups.

Adipokine secretion profiles in mice blood were evaluated. A marked increase in resistin levels ($P < 0.05$) was measured in AD groups (161.9ng/ml for males and 135.6ng/ml for females) compared to SD and VD groups ($P < 0.05$) (Figure 4-3.D). Interestingly, resistin levels were significantly higher in females under SD (111.2ng/ml) and VD (114.4ng/ml) compared to the corresponding male groups (89.8ng/ml; 94.6ng/ml respectively) ($P < 0.05$).

High levels of leptin were found in both VD (575.0ng/ml) and AD (801.1ng/ml) male groups compared to SD group (57.8ng/ml), with a 40% higher level in AD vs. VD groups ($P < 0.001$) (Figure 4-3.E). A comparable hyperleptinemia profile was detected in females under HFD compared to the control group (42.4ng/ml) with a more marked difference (166%) between VD (341.1ng/ml) and AD (908.0ng/ml) groups ($P < 0.001$).

On the other hand, circulating adiponectin was decreased in male mice of VD (1.4 μ g/ml) and AD (1.2 μ g/ml) groups compared to control (2.0 μ g/ml, $P < 0.001$), an effect not observed among female groups (Figure 4-2.F). Moreover, females presented a 5 to 7-fold higher adiponectinemia than corresponding male groups ($P < 0.001$).

Finally, TNF α circulating levels remained unchanged in males and females of the different diet groups (data not shown).

4. Adipokine mRNA expression levels

Adipokine mRNA expression levels were evaluated in the adipose tissue obtained from the abdominal visceral region.

A marked decrease in adiponectin mRNA levels ($P < 0.001$) was measured in white adipose tissue of VD male (0.54) and female (4.53) groups and AD male (0.61) and female (2.84) groups compared to control (1.24 for males and 15.67 for females) (Figure 4-4.A). This decrease was more pronounced in the AD female group compared to the VD group ($P < 0.05$). Overall, adiponectin mRNA levels in HFD-fed females remained 5 to 12 times higher than levels in HFD-fed males.

As seen in blood protein levels, leptin mRNA levels were also significantly increased in white adipose tissue of HFD male mice (3.93 for VD and 5.39 for AD group) compared to control (0.78) ($P < 0.001$) with no difference between the two HFD groups (Figure 4-4.B). In females, on the other hand, VD increased leptin mRNA levels slightly in visceral adipose tissue (2.49) compared to control (0.88) ($P < 0.05$) though AD showed a more marked increase of leptin mRNA (5.37) compared to SD ($P < 0.001$) and VD ($P < 0.001$).

We then evaluated mRNA expression levels of PPAR γ 2, nuclear receptors implicated in adipokine transcription control. HFD significantly reduced PPAR γ 2 mRNA expression in males fed with VD (0.34) and AD (0.21), and in females fed with VD (0.65) and AD (0.46) compared to control ($P < 0.001$) (Figure 4-4.C). However, PPAR γ 2 expression levels remained up to 2-times superior in the abdominal visceral adipose tissue of females compared to the corresponding male groups.

Since previous reports showed crosstalk between estrogens receptors (ER) and PPAR γ regulatory pathways [16], we evaluated the mRNA expression levels of its alpha subtype (ER α). ER α mRNA expression was down-regulated by 70% in male HFD groups and 50% in female HFD groups compared to control ($P < 0.001$) (Figure 4-4.D). No diet-specific difference was detected between HFD groups but ER α mRNA expression was 3 times higher in females compared to the corresponding male groups.

Finally, TNF α mRNA expression levels were unchanged in white adipose tissue in female groups compared to control, but were significantly increased in males fed with AD (24.90) compared to control (2.25) ($P < 0.01$), but not in VD (9.20) (Figure 4-5).

5. Cardiac parameters

To investigate cardiac consequences of HFD, non-invasive measurements of cardiac parameters were performed by Doppler echography. Cardiac-diastolic dysfunction characterized by an elevation of the ratio of the early mitral flow (E) over the late mitral flow (A) and LV hypertrophy was observed in some HFD groups. Thus, a significant increase in E/A ratio by 63% and 59% compared to SD control confirmed diastolic dysfunction in males fed with the VD and AD respectively. Among females, only the AD group showed an increase of this ratio compared to control (Table 4-2), and that by 90%. For its part, LV mass was significantly increased in the mice fed with VD and AD (24% and 18% in males and 17% and 14% in females respectively). This increase of LV mass was essentially caused by the thickness of the interventricular septum and of the LV posterior wall (Table 4-2). Interestingly, the LV hypertrophy in the VD female group was not associated with diastolic-dysfunction as observed in the other HFD groups.

E. Discussion

HFD-induced obesity has become widely accepted as a key factor of alteration in insulin sensitivity and metabolism [9, 11]. However, the physiological regulation and role

of HFD in mediating the unhealthy effects of increased adiposity remain not fully elucidated.

The novelty of this study is the use of two types of HFD identical in their lipid proportion but different in their fat nature. These diets were low in cholesterol in order to reduce its implication in metabolic alterations and mimic industrially-produced popular fast food known as obesity and T2D inducers [9, 11, 19]. Both HFD promoted more weight gain than the control SD with a faster increase in males compared to females. However, the degrees of metabolic alterations differed considerably between the two HFD and were highly influenced by gender. This was not a consequence of the daily caloric uptake but was rather due to the dietary fat nature and mice gender.

For a comparable weight gain in HFD groups, males and females under AD showed a more pronounced accumulation of adipose tissue in the abdominal visceral region compared to corresponding VD groups. Abdominal visceral adipose tissue mass was slightly increased in VD group compared to control but remained non significant when reported as percentage of total body weight. Thus, despite its implication in increasing weight gain, a VD promotes a fat mass distribution different than an AD in both genders. In fact, it is well established that mono-unsaturated FA are more accumulated in the subcutaneous region and prevent central fatty acid accumulation [20]. Furthermore, it was reported that postprandial fat oxidation as well as a meal thermic effect was higher with mono-unsaturated FA rich diet compared to a saturated FA rich diet [21]. The increased thermic effect could reflect a pronounced storage activity of the subcutaneous adipose mass. Thus, we can speculate that our mono-unsaturated FA rich diet trigger a different adipose tissue accumulation than the saturated FA rich AD. However, more experiences are needed to confirm this hypothesis.

This differential fat accumulation plays a crucial role in metabolic alterations development. A link was established between HOMA-IR increase and the visceral adipose tissue accumulation in AD-fed groups. These results support previous findings that demonstrate a correlation between visceral abdominal adipose tissue accumulation and metabolic alterations; a correlation not reported for subcutaneous fat accumulation [22, 23]. High concentrations of saturated FA such as in AD are associated with lipotoxicity effects (pancreas, liver, muscle, adipose tissue...) and alter cell membrane dynamics [24]. This prevents the dimerization of cell surface receptors such as insulin and leptin receptors and inhibits the signalization of the corresponding hormone. Therefore, the increased levels of insulin and leptin in our model could reflect a defect in their respective signalling pathway. In addition, increased insulin level and HOMA-IR are obtained simultaneously with enhanced resistin levels in AD groups. Resistin secretion in adipose tissue is known to induce insulin resistance through the inhibition of its signalling pathway and the stimulation of hepatic glucose production [25]. These data

could explain the fact that AD mice developed increased insulin circulating levels. The VD, rich in unsaturated FA, did not affect insulin levels nor modulates resistin levels in corresponding groups as reported in a previous study with unsaturated oleic acid [26]. So, at similar circulating levels, different combinations of FA promote distinctive alterations in the systemic glucose homeostasis.

Female mice remained normo-glycemic under HFD confirming less advancement in metabolic alterations compared to males. This female-specific resistance to T2D development was even more striking with VD compared to AD, which induced hyperinsulinæmia and slight glucose intolerance. However, VD as well as AD induced T2D with an increased fasting glycaemia and glucose intolerance in male mice and that starting the 12th week of HFD feeding. These alterations could be correlated with adipocytes death demonstrated in HFD-fed male mice [27]. This parameter was however never been investigated in HFD-fed female mice. On the other hand, our preliminary study didn't show any increase in the glycaemia of the HFD-fed female mice even after 16 weeks of diet. We have thus extended our protocol to 20 weeks. It is well established that females show less extensive metabolic alterations due to the oestrogen action that protect adipocytes in female from insulin resistance and inflammation [12, 13, 28]. In our model, we have demonstrated that females had a higher level of ER α mRNA in their adipocytes. Its mRNA expression level could reflect a higher activity of ER α in corresponding tissue. Furthermore, recent evidence shows that FA accumulation is more oriented to the visceral fat pad in male while it is more directed to the peripheral region [29]. Thus, since android fat accumulation is more associated to metabolic alterations development [22], these observations could explain the prevention of T2D development in female groups.

Both HFD increased leptin levels in male and female mice with a significant difference between VD and AD groups. Correlated with body weight increase, high circulating leptin levels, known to improve glucose homeostasis [30], suggests leptin resistance in obese mice. Leptin resistance affects glucose homeostasis and contributes directly to hyperglycaemia [30, 31]. Male mice showed increased leptin levels concurrently with increased AUC values of the IPGTT. In female groups, the apparent lack of negative leptin action on glycaemia could be due to a counterbalanced effect by the high adiponectin levels compared to male groups. Adiponectin, an insulin-sensitizer adipokine and an inhibitor of hepatic glucose production, contributes to improved glucose homeostasis [32, 33].

To evaluate the direct impact of diets on adipose tissue, additional analyses were performed at the mRNA level. TNF α is a key regulator of the adipogenesis that decreases insulin sensitivity and promotes free FA production by stimulating lipolysis and inhibiting the antilipolytic effects of insulin [34, 35]. In our model, TNF α mRNA levels in visceral abdominal adipose tissue were increased in males under AD and, to a much

lesser extent, in VD-fed males. This effect could be due to enhanced macrophage infiltration in the adipose tissue [27, 35, 36]. In the AD group, it was associated with leptin and resistin circulating levels known to augment TNF α production [37, 38]. In the VD group, oleic acid may have contributed to limit TNF α up-regulation. This FA was found to be effective in reversing the inflammatory status in adipose tissue responsible for decreased insulin sensitivity [36]. In the AD female group, despite their increased levels of leptin and resistin, TNF α mRNA levels remained unchanged in the visceral adipose tissue. A high level of circulating adiponectin is known to inhibit TNF α effects [39, 40]. Adiponectinemia in HFD-fed group was reduced in female mice compared to control. However, these levels of adiponectin seem to still be enough to prevent TNF α mRNA up regulation in the adipose tissue. Moreover, it could also have contributed to the delay of T2D development regardless of high leptin levels [40]. However, decreased mRNA expression levels of adiponectin in the adipose tissue of females under HFD could be the first sign of progression toward a metabolic alteration cascade.

Thus, adiponectin modulation seems to play a critical role in our model and could contribute to differences between males and females, with delayed metabolic alterations in the latter.

Hyperplasia and hypertrophy of adipocytes are involved in obesity [41]. The balance between the two processes is controlled by FA nature that governs nuclear receptors activity [42]. Therefore, inhibition of adipogenesis through high levels of circulating FA triggers adipocytes hypertrophy and leads to insulin resistance [43], a situation encountered in the AD mice group. In contrast with the oleic-rich VD-fed groups, metabolic alterations were less extensive with an absence of hyper-insulinemia. In this case, adipocyte hypertrophy and hyperplasia occurred. Hyperplastic obesity is accepted as being less harmful regarding metabolic alterations and adipose tissue inflammation [35, 36].

Dietary FA modulate PPAR γ activity which controls adipokines secretion [43, 44]. Superior adipogenesis potential in white adipose tissue of the abdominal visceral region of females over males is suggested by the pattern of expression levels of the PPAR γ 2 gene. Our results showed decreased levels of PPAR γ 2 mRNA in HFD groups and remained higher in females compared to males. The highest levels were found in the VD female group protected against HFD-mediated negative metabolic impacts. These results support the hypothesis about the role of PPAR γ 2 in preventing adipocytes hypertrophy that leads to decrease adiponectin circulating levels and insulin sensitivity.

In previous studies, crosstalk between the estrogens receptors and PPAR γ regulatory pathways has been demonstrated with sex hormone regulation of adipokine production [16, 42]. Expression of ER α , a main mediator of oestrogen effects, was

investigated as it could be involved in the gender regulation and/or diet-specific response of adipose tissue. In this study, ER α mRNA levels in adipocytes were decreased with HFD but remained higher in female groups. Such higher expression levels of ER α in females may favour PPAR γ 2 mRNA expression under HFD when compared to males [16].

Signs of cardiac diastolic dysfunction linked to weight gain and metabolic alterations were also detected in the HFD groups. An increase of the E/A ratio, with restrictive aspects of transmitral flow (E/A>2), indicated a diastolic dysfunction with increased LV filling pressure. A significant elevation of the E/A ratio occurred in males fed with the VD or AD (63% and 59%, respectively) and a 90% increase in the AD female group only. Females on VD had no modification of the E/A ratio despite being overweight. Obesity can be associated with impaired LV diastolic function [45] though the exact reason is still unclear. Leptin regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsible for blood pressure regulation [31], is disturbed in obese subjects. Thus, high leptin concentration leads to diastolic dysfunction associated with higher cardiac sympathetic nervous system activity and increased LV mass [45]. This dysfunction with a reduction in cardiac compliance was associated with LV dilatation and an increased LV mass in HFD groups.

Hyperglycaemia and hyper-insulinæmia have also been suggested to be additive stimuli to LV hypertrophy [46]. Thus, the fasting hyperglycaemia in male mice under HFD and the elevated level of circulating insulin in mice under AD could have aggravated cardiac hypertrophy and alteration. In fact, in glucose diabetic and insulin resistant mice, the myocardium consumes more FA to produce energy leading to more LV hypertrophy. Female mice under VD increased their LV mass without diastolic dysfunction. The normal glycemic and insulin rates in the presence of higher adiponectin concentration compared to the male group contributed to maintain normal diastolic function. Furthermore, the VD contains 27% more oleic acid, which is known to prevent cardiac dysfunctions [47], than the AD. These differences in diet composition could explain the prevention of diastolic dysfunction in the female VD group but not in the female AD group.

Metabolic alterations development is different between males and females. However, the majority of studies on HFD-induced metabolic disorders are restricted to males [48]. The strength of this work was therefore the evaluation of the respective sensitivity of both sexes to two types of low-cholesterol HFD, differing in their dietary FA nature. Thus, we have shown that combinations of FA have gender-related effects on visceral fat distribution and metabolic consequences. Therefore, susceptibility to develop HFD-linked T2D is strongly reflected by sex hormone-associated modulation of adiponectin production, TNF α and PPAR γ regulation in visceral adipose tissue. However,

further investigation will be required to explain the differences in response to the two types of HFD among females.

Understanding gender-specific adipose tissue adaptations underlying metabolic disorders linked to HFD and unhealthy lifestyles will considerably contribute to the development of improved strategies for the prevention and treatment of metabolic and cardiovascular diseases.

F. Conclusions

Combinations of FA have gender-related effects on visceral fat distribution and metabolic consequences. Susceptibility to develop HFD-linked T2D is strongly reflected by gender modulation of adiponectin production, TNF α and PPAR γ regulation in visceral adipose tissue. The evaluation of the hormone modulations in our mice model could provide more answers on the remained unclear sex differences.

G. Appendix

Abreviation

AD: Animal high fat Diet

ANCOVA : analysis of covariance

ER α : Estrogens Receptor alpha

FA : Fatty Acid

HFD : High Fat Diets

IPGTT : Intra-Peritoneal Glucose Tolerance Test

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma

SD : Standard Diet

T2D: Type 2 Diabetes

TNF α : Tumour Necrosis Factor alpha

VD : Vegetal high fat Diet

Authors' contributions:

SEA and VL carried out the physiological follow up of the mice and assays *in vivo*. Molecular and biochemical studies and the drafting of the manuscript were completed by SEA. IC as well as JFT participated in the design and the coordination of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing of interest

Neither of the authors has any potential benefits or conflicts of interest to disclose.

Funding

This study was financed by a grant from the fondation des maladies du Coeur du Québec and the Montreal Heart Institute foundation.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Maya Mamarbachi from the Montreal Heart Institute for molecular biology advices and Mariève Cossette from the Montreal Heart Institute Coordinating Centre for the statistical analyses.

Disclosures

Neither of the authors has any potential benefits or conflicts of interest to disclose.

H. References:

1. Schuster DP: **Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation.** *Diabetes Metab Syndr Obes*, **3**:253-262.
2. Ahima RS: **Digging deeper into obesity.** *J Clin Invest*, **121**:2076-2079.
3. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M: **Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases.** *World J Gastroenterol*, **17**:2801-2811.
4. Schwartz DR, Lazar MA: **Human resistin: found in translation from mouse to man.** *Trends Endocrinol Metab*, **22**:259-265.
5. Wauman J, Tavernier J: **Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance.** *Front Biosci*, **17**:2771-2793.
6. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijzer J: **The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue.** *J Cell Physiol* 2008, **216**:3-13.
7. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L: **Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome.** *Biochim Biophys Acta*, **1801**:209-214.
8. Declercq V, Taylor C, Zahradka P: **Adipose tissue: the link between obesity and cardiovascular disease.** *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008, **8**:228-237.
9. Bessesen DH: **Update on obesity.** *J Clin Endocrinol Metab* 2008, **93**:2027-2034.
10. Mirza MS: **Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *ISRN Gastroenterol*, **2011**:592404.
11. Shertzer HG, Woods SE, Krishan M, Genter MB, Pearson KJ: **Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet.** *J Nutr*, **141**:582-587.
12. Medrikova D, Jilkova ZM, Bardova K, Janovska P, Rossmeisl M, Kopecky J: **Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control.** *Int J Obes (Lond)*.
13. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR: **Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism.** *Diabetes* 2009, **58**:803-812.
14. Moussavi N, Gavino V, Receveur O: **Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity?** *Obesity (Silver Spring)* 2008, **16**:7-15.
15. Funaki M: **Saturated fatty acids and insulin resistance.** *J Med Invest* 2009, **56**:88-92.
16. Jeong S, Yoon M: **17beta-Estradiol inhibition of PPARgamma-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression.** *Acta Pharmacol Sin*, **32**:230-238.
17. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** *Diabetologia* 1985, **28**:412-419.
18. Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Tahara H, Koyama H, Ishimura E, Miki T, Tabata T, Nishizawa Y: **Insulin resistance as an independent predictor of**

- cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13**:1894-1900.
19. Stender S, Dyerberg J, Astrup A: **High levels of industrially produced trans fat in popular fast foods.** *N Engl J Med* 2006, **354**:1650-1652.
 20. Paniagua JA, Gallego de la Sacristana A, Romero I, Vidal-Puig A, Latre JM, Sanchez E, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F: **Monounsaturated fat-rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects.** *Diabetes Care* 2007, **30**:1717-1723.
 21. Piers LS, Walker KZ, Stoney RM, Soares MJ, O'Dea K: **The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream).** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002, **26**:814-821.
 22. Kang SM, Yoon JW, Ahn HY, Kim SY, Lee KH, Shin H, Choi SH, Park KS, Jang HC, Lim S: **Android fat depot is more closely associated with metabolic syndrome than abdominal visceral fat in elderly people.** *PLoS One*, **6**:e27694.
 23. Saad F, Gooren LJ: **The role of testosterone in the etiology and treatment of obesity, the metabolic syndrome, and diabetes mellitus type 2.** *J Obes*, **2011**.
 24. Manco M, Calvani M, Mingrone G: **Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion.** *Diabetes Obes Metab* 2004, **6**:402-413.
 25. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: **The hormone resistin links obesity to diabetes.** *Nature* 2001, **409**:307-312.
 26. Rea R, Donnelly R: **Effects of metformin and oleic acid on adipocyte expression of resistin.** *Diabetes Obes Metab* 2006, **8**:105-109.
 27. Altintas MM, Rossetti MM, Nayer B, Puig A, Zagallo P, Ortega LM, Johnson KB, McNamara G, Reiser J, Mendez AJ, Nayer A: **Apoptosis, Mastocytosis, and Diminished Adipocytokine Gene Expression Accompany Reduced Epididymal Fat Mass in Long-Standing Diet-Induced Obese Mice.** *Lipids Health Dis*, **10**:198.
 28. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Nunez NP: **Estrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance.** *Diabetes Obes Metab*.
 29. Koutsari C, Ali AH, Mundi MS, Jensen MD: **Storage of circulating free fatty acid in adipose tissue of postabsorptive humans: quantitative measures and implications for body fat distribution.** *Diabetes*, **60**:2032-2040.
 30. Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, Jou W, Pack S, Asghar Z, Wheeler MB, LeRoith D: **Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes.** *Endocrinology* 2005, **146**:4024-4035.
 31. Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ: **Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, **283**:E187-192.
 32. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, et al: **Adiponectin stimulates glucose utilization and**

- fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.** *Nat Med* 2002, **8**:1288-1295.
33. Kadowaki T, Yamauchi T: **Adiponectin and adiponectin receptors.** *Endocr Rev* 2005, **26**:439-451.
 34. Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ: **Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output.** *Endocrinology* 1992, **130**:43-52.
 35. Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM: **The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA.** *Proc Nutr Soc*, **69**:232-243.
 36. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH: **Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems.** *Lipids Health Dis* 2009, **8**:25.
 37. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC: **Adipokines and insulin resistance.** *Mol Med* 2008, **14**:741-751.
 38. Warne JP: **Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass.** *J Endocrinol* 2003, **177**:351-355.
 39. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B: **Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, **285**:E527-533.
 40. Zhao T, Hou M, Xia M, Wang Q, Zhu H, Xiao Y, Tang Z, Ma J, Ling W: **Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor-alpha expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways.** *Cell Immunol* 2005, **238**:19-30.
 41. Fernandez-Quintela A, Churrucua I, Portillo MP: **The role of dietary fat in adipose tissue metabolism.** *Public Health Nutr* 2007, **10**:1126-1131.
 42. Shi H, Clegg DJ: **Sex differences in the regulation of body weight.** *Physiol Behav* 2009, **97**:199-204.
 43. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, et al: **PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.** *Mol Cell* 1999, **4**:597-609.
 44. Brown JD, Plutzky J: **Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets.** *Circulation* 2007, **115**:518-533.
 45. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, Dell'Oro R, Arenare F, Spaziani D, Mancia G: **Sympathetic and baroreflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular dysfunction.** *Hypertension* 2009, **53**:205-209.
 46. Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, Dincer UD, Besch HR, Jr.: **Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels.** *Diabetes* 2003, **52**:1825-1836.

47. Carrero JJ, Fonolla J, Marti JL, Jimenez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E: **Intake of fish oil, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E for 1 year decreases plasma C-reactive protein and reduces coronary heart disease risk factors in male patients in a cardiac rehabilitation program.** *J Nutr* 2007, **137**:384-390.
48. Srinivasan K, Ramarao P: **Animal models in type 2 diabetes research: an overview.** *Indian J Med Res* 2007, **125**:451-472.

I. Table & figure legends

Table 4-1. Diets compositions as analyzed by the manufacturer (Research Diets, Inc).

Table 4-2. Evaluation of cardiac parameters by Doppler echography. The early wave (E) and the late wave (A) of the mitral flow. LV mass was calculated by the measurement of the inter-ventricular septum, posterior wall thicknesses, and the tele-diastolic diameter. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. SD; #### P < 0.001 vs. VD.

Figure 4-1. Kinetic of weight gain in male (A) and female (B) mice (n=10). The mean cumulative food intake (C) was evaluated during the protocol in g/day/mouse (white column) and kCal/day/mouse (hatched column). White fat pad mass (D) is expressed as the weight of adipose tissue extracted from the abdominal visceral region of each mouse (white column) and transposed in percentage of total body weight (hatched column) at the time of the sacrifice (n=9). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. SD; #### P < 0.001 vs. VD.

Figure 4-2. Glycemic parameters: After overnight fasting, IPGTT challenge was carried at the end of the protocol in males (A) and females (B) (n=9). From these curves, AUC were calculated to estimate glucose tolerance in corresponding mice (C). Fasting glycemia (D) was measured at the beginning of the IPGTT. * P < 0.05, *** P < 0.001 vs. SD.

Figure 4-3. Circulating levels of insulin (A), FA (C), resistin (D) leptin (E) and adiponectin (F) circulating levels were evaluated at the sacrifice after overnight fasting in all mice groups (n=8). HOMA-IR (B) was calculated according to fasting glycemia and insulinemia using the following formula: $HOMA-IR = \frac{\text{fasting glucose (mM)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml})}{22.5}$. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. SD; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. VD.

Figure 4-4. Expression profile of adipokines genes. Adiponectin (A), leptin (B), PPAR γ 2 (C) and ER α (D) mRNA expression levels in abdominal visceral white adipose tissue extracted from all groups (n=8) were evaluated by Q-PCR. mRNA expression level was reported as a ratio over the expression level of the reference gene Cyclophilin-A. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. SD; # P < 0.05, ### P < 0.001 vs. VD.

Figure 4-5. TNF α gene expression profile. TNF α mRNA expression levels in abdominal visceral white adipose tissue extracted from male and female (n=8) of SD, VD and AD mice groups. mRNA expression level was evaluated by Q-PCR and reported as a ratio over the expression level of the reference gene Cyclophilin-A. *P<0.05, ***P<0.001 vs. SD; ####P<0.001 vs. VD.

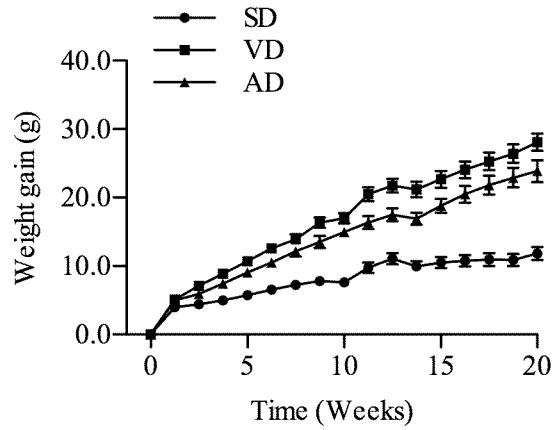
Table 4- 1 Diets compositions

Manufacture Cat#	ResearchDiet D12492	ResearchDiet D06061202	Harlan-Teklad 2018
Components	VD	AD	SD
Sucrose	26,3%	26,3%	57%
Lipid	34,9%	34,9%	6%
FA composition :			
	g/100g of diet		
C12 Lauric	0	0	0,026
C14 Myristic	0,2	0,9	0,006
C14:1 Myristoleic	0	0,5	0
C16 Palmitic	13,0	21,8	0,764
C16:1 Palmitoleic	0,2	3,8	0
C18 Stearic	10,2	12,4	0,15
C18:1 Oleic	62,0	39,3	1,26
C18:2 Linoleic	12,9	12,8	3,13
C18:3 Linolenic	0,7	1,6	0,28
C20 Arachidic	0,3	0	0,01
C20:4 Arachidonic	0	1,7	0
C22 Behenic	0,3	0	0,003
C24 Lignoceric	0,1	0	0
Cholesterol	0,035	0,030	
FA proportions :			
	Pourcentage of total FA		
Saturated FA	24,2%	37,0%	16,96%
Mono-unsaturated FA	62,2%	46,0%	22,71%
Poly-unsaturated FA	13,6%	17,0%	60,33%

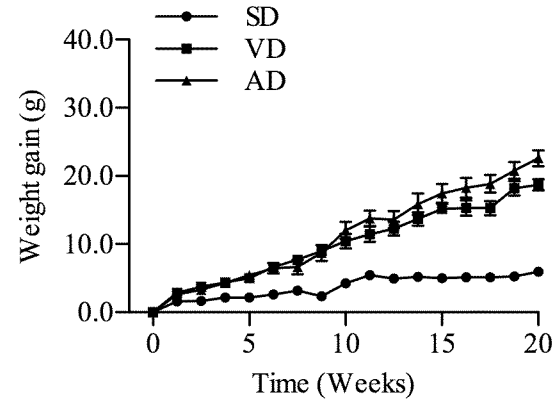
Table 4- 2 Alteration in cardiac parameters

Sex group	Diet group	E/A ratio ± SEM	LV mass (mg) ± SEM	Inter-ventricular septum (mm) ± SEM	LV posterior wall (mm) ± SEM
Males	SD	1.39±0.15	109.8±2.6	0.72±0.01	0.76±0.02
	VD	2.27±0.14***	135.7±7.5 **	0.83±0.03 **	0.85±0.02 **
	AD	2.20±0.08***	129.8±6.2 **	0.89±0.02 ***	0.84±0.01 *
Females	SD	1.56±0.05	101.1±2.7	0.77±0.01	0.70±0.02
	VD	1.62±0.08	118.7±5.0 *	0.86±0.03 **	0.78±0.02 *
	AD	3.01±0.45*** ###	115.7±3.6 *	0.85±0.03 *	0.79±0.01 **

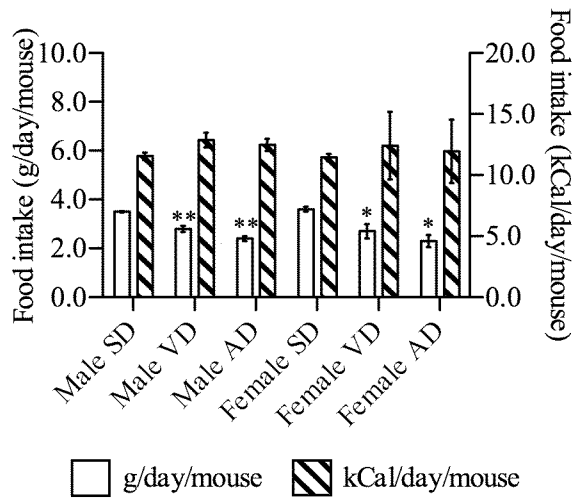
A



B



C



D

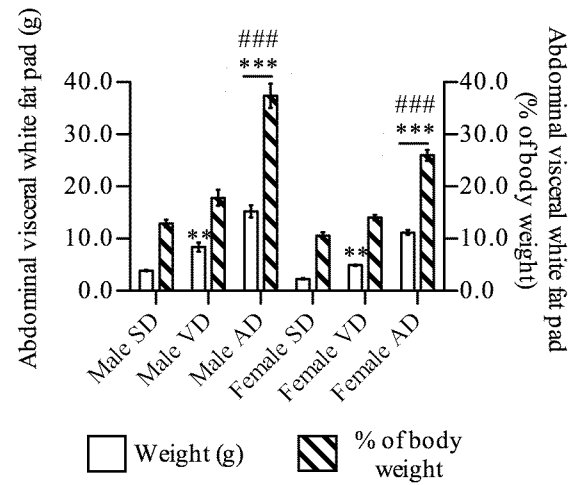
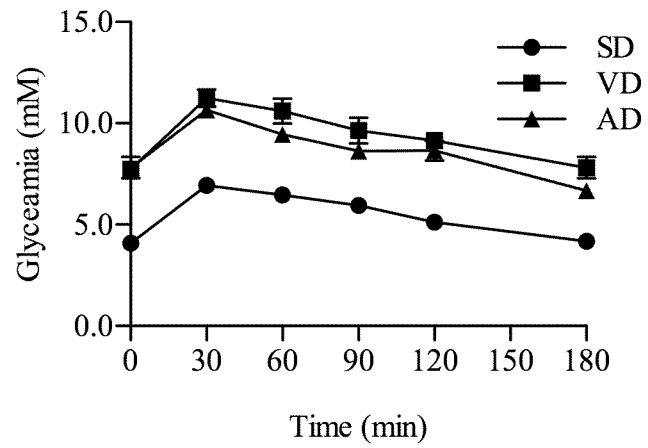
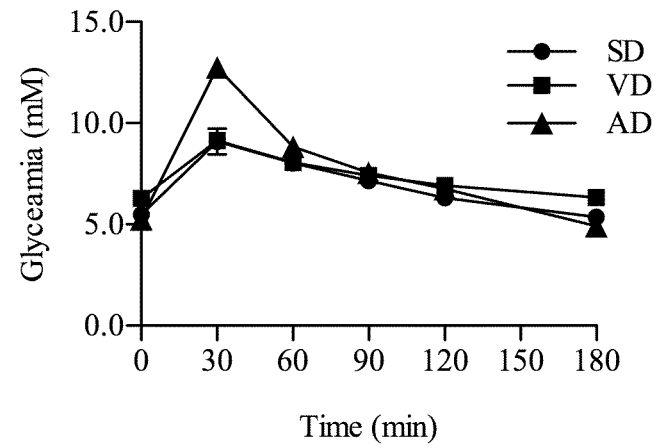


Figure 4- 1 Kinetic of weight gain

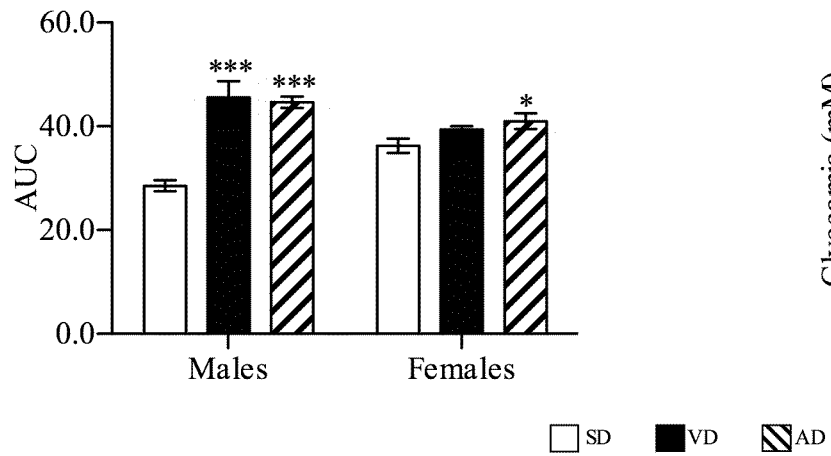
A



B



C



D

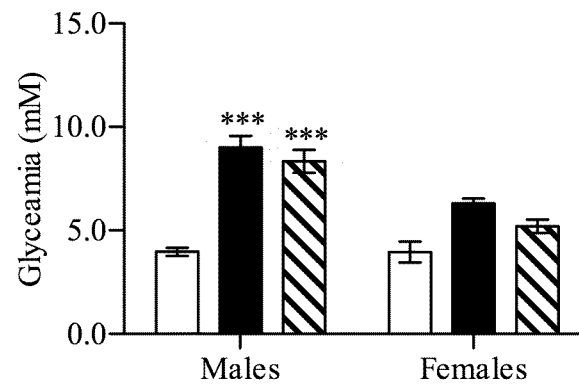


Figure 4- 2 Glycemic parameters

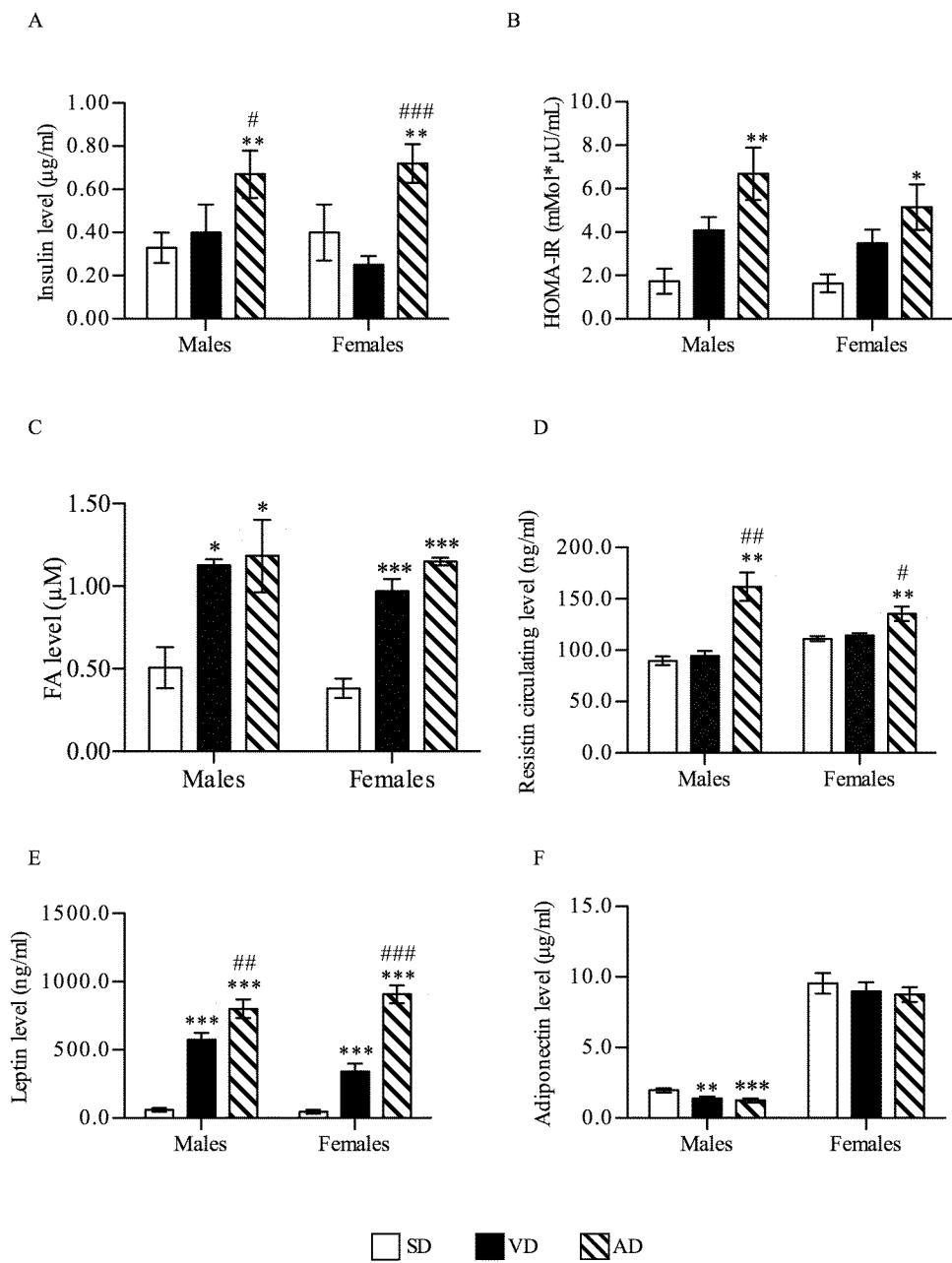
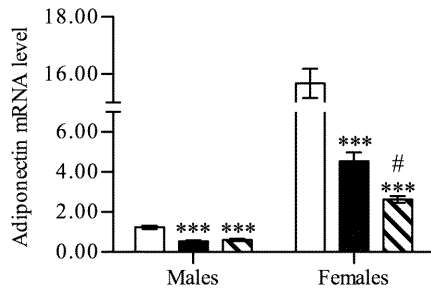
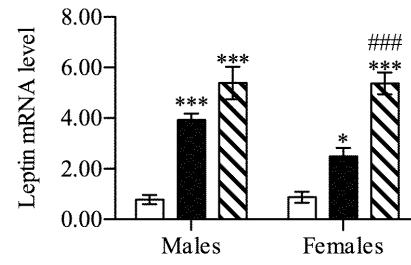


Figure 4- 3 Adipokines secretion profile

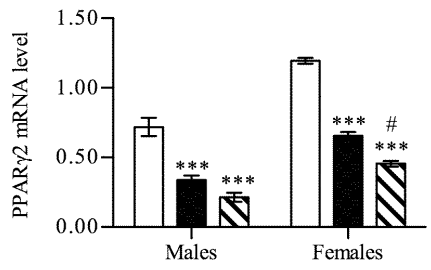
A



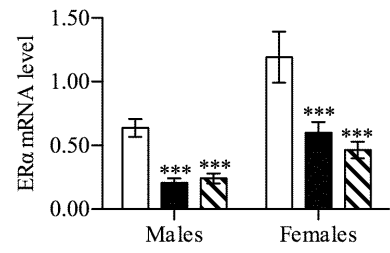
B



C



D



□ SD ■ VD ▨ AD

Figure 4- 4 Adipokines genes expression profile

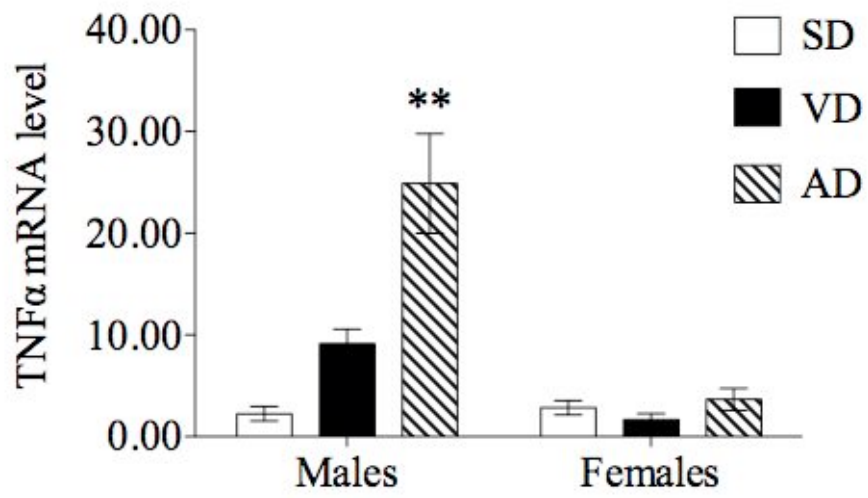


Figure 4- 5 TNF α gene expression profile

V. Adipocytes from male and female mice fed with high-fat-diets, differently alter vascular smooth muscle cells phenotype.

Submitted to *The Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* in December 2011

Souhad El Akoum, Vikie Lamontagne, Isabelle Cloutier and Jean-François Tanguay

Running title: Adipocytes influence vascular alterations.

A. Abstract

Obesity and type 2 diabetes-associated vascular smooth muscle cells (VSMC) alterations are recognized as predisposition factors to atherosclerosis development. We aimed at investigating the role of adipocyte secreted factors in the development of VSMC phenotypic and functional alterations.

Five weeks old male and female C57BL/6J mice were fed for 20 with either a standard diet or a high-fat-diet (HFD) composed of vegetal or animal fat. HFD induced-obesity was associated, in link with gender and diet nature, with different stages of metabolic disorders. Adipocytes isolated from each mouse were used to condition culture media and stimulate VSMC. Compared to control, adipocytes from mice fed with HFD alter VSMC proliferation, migration and viability in a sex-related manner. The most extended effects on VSMC were triggered for males by adipocytes from mice fed with animal HFD while for female these were linked to vegetal HFD. These effects were concurrent to increased leptin concentration and decreased adiponectin levels in supernatants of adipocytes from HFD mice groups. These supernatants increased CD36 mRNA expression level and triggered apoptosis in VSMC.

The present study demonstrated that the development of adipocyte-induced VSMC alterations is sex related, linked to diet fatty acid composition and degree of metabolic alteration. Adipocyte secreted factors trigger VSMC functional alterations and apoptosis and therefore may impact on vascular pathogenesis.

B. Introduction

Obesity and type 2 diabetes (T2D) are recognized as predisposition factors to atherosclerosis development. Endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) are sensitive to obesity-linked increased fatty acids (FA) and T2D-linked hyperglycaemia that trigger vascular alterations and lead to atherogenesis¹⁻³. A lack in insulin sensitivity lowers intracellular glucose availability, forcing arterial cells to use FA as an alternative energy source. Thus, in atheroprone regions susceptible to plaque formation, EC and VSMC are subjected to metabolic modifications that lead to accumulation of oxidized LDL (oxLDL) in the intima⁴ and progression of vascular disease.

At the early stage of atherogenesis, the endothelium exposed to oxLDL becomes activated and upregulates expression of adhesion molecules (ICAM, VCAM). These molecules allow monocyte recruitment and trans-endothelial migration into the intima

where they differentiate into macrophages to initiate the inflammatory response⁴. For their part, VSMC undergo "phenotypic switching" showing less contractility with increased proliferation and migration toward the intima to contribute to its thickening and formation of atherosclerotic plaques^{5, 6}. With time, VSMC may go through a cholesterol-induced trans-differentiation into foam cells contributing to the atherogenic process⁷. These cells have a macrophage like phenotype correlated with increased level of oxLDL scavenger receptor CD36 and lipid accumulation⁸.

Factors implicated in VSMC alterations linked to obesity and T2D remain incompletely understood. The impact of adipose tissue secretion of adipokines that regulate various set of metabolic and physiologic processes including pro-inflammatory cytokines could not be discarded^{9, 10}. In lean humans, macrophages represent 10% of cells in the adipose tissue but can reach 40% in obese¹¹.

Obesity induces complex changes not only in macrophages but also in adipocytes. Following FA stimulation, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), is activated¹². PPAR γ encompass two isoforms: PPAR γ 1, expressed in many tissues where it controls glucose and lipid homeostasis, and the adipocyte specific form PPAR γ 2 which further governs preadipocytes differentiation, lipogenesis and adipokines secretion¹². Among these secreted factors are found leptin and adiponectin two important regulators of glucose and lipid homeostasis¹³⁻¹⁵.

Little is known on the effect of these adipokines on VSMC. Thus, since obesity-increased FA is an important inducer of metabolic disorders and vascular pathogenesis, and regulates adipose tissue activity, we hypothesized that adipocytes through adipokines secretion play an important role in VSMC alterations that could lead to atherosclerosis formation.

Therefore, the present study aimed to determine the effect on VSMC physiology of factors secreted by adipocytes isolated from mice fed with high fat diet (HFD). We focused our investigation on isolated adipocytes to exclude the impact of other cell types found in the adipose tissue such as macrophages.

To reach our objective, we used isolated adipocytes to condition VSMC culture media. We evaluated the mechanistic contributions of diet on VSMC by exposing them to adipocytes supernatants (AdS) of mice fed vegetal or animal HFD. This enabled us to study the transposition of diet-induced fat cell modifications into extended alterations in the physiology of VSMC mediated by paracrine actions of adipocytes.

C. Materials and Methods

1. Experimental protocol

Adipocytes were obtained from C57BL/6J male and female mice fed with HFD for 20 weeks¹⁶. Mice were fed with one of two low cholesterol HFD (34.9% fat, 26.3% carbohydrate, cholesterol <0.03%; ResearchDiet): a vegetal HFD (VD) composed of soy and cotton oil and an animal HFD (AD) composed of lard. The common standard diet (SD) was used as control (6% fat, 57% carbohydrate; Harlan-Teklad). The animal protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the Montreal Heart Institute.

2. Adipocyte culture

Mouse white adipocytes were isolated from visceral-abdominal adipose tissue obtained by dissection at the sacrifice. Briefly, adipose tissue was finely minced and enzymatically digested in Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium (DMEM) containing 2mg/ml type I collagenase (37 ; 40 min). The digestion mixture tissue was then centrifuged (300xg; 7min) and the top white supernatant is filtered through 100µm filter and washed twice in DMEM.

Adipocytes (10^4 cells/ml) were maintained in a low glucose DMEM, without serum, supplemented or not with insulin (100µU/ml) and/or glucose (25mM) for 24hr. AdS were collected and immediately stored at -20°C . At the moment of experimentation, samples were thawed (37°C ; 1h) and added on VSMC culture.

To simplify annotations, supernatant of unstimulated adipocytes was noted as AdS-U, supernatant of insulin-stimulated adipocytes as AdS-I, supernatant of glucose-stimulated adipocytes as AdS-G and supernatant of insulin and glucose-stimulated adipocytes as AdS-IG.

3. VSMC culture

VSMC were isolated from 10 weeks old C57BL/6J mice as previously described¹⁷. Briefly, dissected aorta were discarded of its adventitia, cut in 2mm square pieces then incubated in 1.5mg/ml collagenase type II solution (37°C ; 5%CO₂; 5hr). Dissociated cells were suspended in 5 ml of DMEM and centrifuged (300xg; 5min). Cell pellet was suspended in 700µl DMEM supplemented with 10% fetal-bovine-serum (FBS) and transferred to a single well of a 48-well plate and left untouched for 5 days. VSMC purity was evaluated by confocal microscopy after 4 passages of amplification (Supplementary data) before there treatment with AdS. In order to eliminate gender

interactions between factors secreted by adipocytes and VSMC, these latter were stimulated by AdS from adipocytes of the same gender. To separate the effect of insulin and glucose from the effect of adipocytes secreted factors on VSMC in AdS, insulin and/or glucose stimulations on VSMC were used as controls for each experiment. Each condition was tested in duplicate for each experiment.

4. Cell proliferation assays

VSMC were plated in 96 wells plates at a density of 10^4 cells per well in DMEM contained 10% FBS and allowed to attach and grow to sub-confluent density for 24hr before a 48hr synchronization step in DMEM contained 0,1%FBS. Proliferation of VSMC was assessed by manual count and expressed as percentage compared to control.

5. Cell migration assay

Confluent VSMC were serum starved overnight before a 24hr treatment with AdS or appropriate controls. Cells (5×10^3) were loaded in the upper chamber of a 24-transwell plate with an 8 μ m pore membrane. The chemo-attractant fibroblast growth factor (bFGF) (10ng/ml) was added to the DMEM in the lower chambers. Following incubation (37°C; 5%CO₂; 5hr), the membrane was fixed with paraformaldehyde, stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole and scanned on microscope. The number of migrated cells was counted in five random fields for each sample. Each condition was done at least twice in duplicate using different pooled cells. Results are expressed as percentage compared to control.

6. Quantification of mRNA level

Total RNA was isolated using Qiazol reagent according to the manufacture's instructions (Qiagen, Toronto, ON, Canada). Single-strand cDNA was synthesized according to the procedure in the iScript cDNA Synthesis Kit manual (Bio-Rad Laboratories, Montreal, QC, Canada). Q-PCR reactions were carried out using the Brilliant-II SYBR® Green Master-Mix (Stratagene, Mississauga, ON, Canada) and specific primers (Table 5-3) for CD36 scavenger receptor, insulin receptor (InsR), Bax and Fatty Acid Synthase (FAS). The mRNA levels were normalized to Cyclophilin-A expression level. The targeted and reference genes were amplified in duplicate in the same run using the Mx3000P Q-PCR System (Stratagene).

The relative quantification of target genes was determined using the MxPro™ Q-PCR software version 3.00 (Stratagene). Briefly, Ct average of each duplicate was calculated for each gene and Cyclophilin A and the Δ CT (CT_{gene} – CT_{Cyclo-A}) was determined. The control adipose tissue sample was chosen as reference sample and seted as 100% of gene quantity. Finally, the mRNA abundance of other samples to the mRNA abundance of the control adipose tissue was calculated with use of the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Each experiment was done in duplicate.

7. Caspase-3 activity

Caspase-3 activity in VSMC was measured using the synthetic substrate N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroalanilide (Ac-DEVD-pNA) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) diluted to 40 μ M in reaction buffer composed of 100mM Hepes, pH 7.3, 300mM sucrose, 10mM DTT and 0.1% Nonidet P-40. VSMC were homogenized in RIPA lysis buffer and 100 μ g protein of each extract was incubated (37°C; 1hr) in 0.2ml of reaction buffer-substrate mix. The reaction use Ac-DEVD-pNA as a substrate hydrolyzed by caspase-3 to generate Ac-DEVD + p-nitroalanilide. The amount of hydrolyzed substrate (p-nitroalanilide), expressed in μ M, is then measured at 405nm. This amount is directly correlated to the caspase-3 activity. As positive control of caspase-3 activity, VSMC were irradiated for 5 min with a short wave UV lamp washed once and incubated in DMEM/10% FBS for 24hr. Each experiment was done in triplicate.

8. Biochemical assay

The concentration of adiponectin and leptin in AdS was measured using mouse ELISA kits according to the manufacturer's protocol (ALPCO). Prior analysis, samples were thawed on ice and rapidly used. Each condition was evaluated in duplicate.

9. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed separately for males and females. Data are presented as mean \pm standard deviation for continuous variables.

Repeated measures analysis of variance (ANOVA) models were used to compare the adipocytes' supernatant adiponectin and leptin levels between groups (SD, VD and AD groups). The cell proliferation, migration and mRNA levels were compared between groups (SD, VD and AD groups) using an ANOVA model.

In addition, the relationships among adiponectin and leptin levels, mRNA levels and proliferation and migration parameters were investigated using Pearson or Spearman correlations according to the nature of the data distribution.

All analyses were done using SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and conducted at the 0.05 significance level.

D. Results

We have previously shown¹⁶ that HFD trigger obesity in corresponding mouse groups correlated with increased leptin levels in systemic circulation (Table 5-1). Male mice developed T2D in HFD groups also linked to decreased adiponectin levels in sera¹⁶. In AD group, mice demonstrated hyperinsulinemia in both genders. The blood profile of adipokines was shaped by the diet as reflected by a decreased adiponectin and an increased leptin mRNA levels in abdominal visceral white adipose tissue of HFD-fed mice compared to the SD-fed mice (Table 5-2). To characterize the effect of these modulations on VSMC, abdominal adipocytes were isolated from each mouse to condition culture media.

1. Effects of AdS on VSMC proliferation

Insulin and/or glucose stimulations significantly increase by up to 37% the proliferation VSMC after 24hr of treatment compared to unstimulated cells (Figure 5-5.A). To examine how AdS can modulate this parameter, VSMC were incubated for 24hr with adipocytes culture media in presence or not of insulin and/or glucose. Results are expressed as percentage of proliferation of VSMC exposed to AdS compared to VSMC not exposed to AdS, in both cases stimulated or not with insulin and/or glucose. Proliferation rate of unstimulated VSMC is referred as 100%.

Secreted factors from unstimulated adipocytes of SD-fed males decreased by 30% the proliferation of VSMC compared to cells unexposed to AdS (Figure 5-1.A). A more marked inhibition was obtained with adipocytes from AD group that decreased by 60% VSMC proliferation ($42.74\% \pm 0.12$) compared to SD ($68.18\% \pm 0.06$) and VD ($67.10\% \pm 0.09$) groups. AdS-I maintained the same inhibitor effect on VSMC proliferation in VD ($65.60\% \pm 0.07$) and AD ($61.50\% \pm 0.09$) groups. However, insulin treatment of adipocytes of SD group increased their anti-proliferative effect ($48.10\% \pm 0.02$) compared to AdS-U. Stimulation of adipocytes with either glucose alone or combined to insulin abrogates the capacity of adipocyte to reduce VSMC proliferation rate and this, for all diet-groups.

In females, AdS-U inhibits VSMC proliferation in SD ($58.50\% \pm 0.03$) and VD ($79.20\% \pm 0.08$) groups with no significant effect in AD group ($91.80\% \pm 0.16$) compared to control (Figure 5-1.B); a major difference with male AD group ($42.74\% \pm 0.12$). Insulin treatment completely inhibits the anti-proliferative effect of VD adipocytes ($98.66\% \pm 0.09$) but had no impact on SD. However, AdS-IG prompts VSMC proliferation up to 30% and abrogates differences between diet groups. Finally, VSMC proliferation was partially restored under AdS-G in SD group ($83.71\% \pm 0.03$) compared to AdS-U from SD group ($58.50\% \pm 0.03$) without any significant effect on VD ($103.61\% \pm 0.11$) and AD ($114.31\% \pm 0.15$) groups.

2. Effects of AdS on VSMC migration

Migration ability is another important physiologic characteristic of VSMC. Insulin and/or glucose treatments significantly increased VSMC migration by 10 to 33% compared to untreated cells (Figure 5-5.B). To characterize the impact of AdS on VSMC physiology, we evaluated VSMC migration capacity after 24hr of treatment with AdS. In males, for all AdS for SD-derived adipocytes, migration of VSMC was reduced but at a lesser extent in the case of AdS-G (Figure 5-1.C). In contrast, all AdS from HFD-fed mice showed a strong pro-migratory effect on VSMC. This diet effect was more prominent in HFD groups with AdS-I (200%), AdS-IG (230%) and AdS-G (260%) compared to AdS-U.

In female group, once again for all AdS of SD group, VSMC migration was reduced by 20 to 30% compared to control (Figure 5-1.D). In strong contrast with the effect of the male-derived AdS-U, female-derived AdS-U demonstrated an inhibitory effect on VSMC migration, and this is more marked in VD ($30.83\% \pm 0.02$) and AD ($26.32\% \pm 0.03$) groups than in SD group ($74.82\% \pm 0.04$). This inhibitory effect is equivalent with AdS-I of SD group ($73.20\% \pm 0.03$), but reduced in VD group ($61.71\% \pm 0.07$) and totally abrogated with AdS-I from AD group ($100.11\% \pm 0.05$) compared to AdS-U. Finally, glucose stimulation triggers AdS pro-migratory effect on VSMC but only among AdS-G of female HFD groups ($120.00\% \pm 0.03$ for VD group and $125.60\% \pm 0.06$ for AD group) which represents a 15% increase compared to AdS-IG.

3. Gene expression

The impact of AdS on VSMC could be linked to FA released by adipocytes. Modulation of FA receptors expression may be an indicator of their implication in VSMC alteration. We evaluated CD36 mRNA expression level in VSMC, a scavenger receptor recognized for its role in the atherogenesis process⁸. Insulin stimulation increases CD36

mRNA expression level by 2 fold in VSMC compared to unstimulated and glucose stimulated cells. As well, glucose alone increases CD36 mRNA level by 30% (Figure 5-5.C). In males, when VSMC are exposed to AdS-U from HFD groups, CD36 mRNA level is significantly enhanced (0.48 ± 0.05 for VD; 0.88 ± 0.55 for AD) compared to SD group which had no effect (0.02 ± 0.13) (Figure 5-2.A). AdS-I of all diet groups increased CD36 mRNA expression level in VSMC with still higher levels in VD (1.84 ± 0.09) and AD (2.10 ± 0.02) groups compared to SD group (1.03 ± 0.11). AdS-G increased scavenger receptor mRNA expression in VSMC in SD (0.43 ± 0.15), VD (0.90 ± 0.03) and AD (1.07 ± 0.02) groups following a similar pattern but at a lesser extent than AdS-I. A cumulative impact was observed in AdS-IG stimulation in SD (1.99 ± 0.14) and AD (2.67 ± 0.02) groups compared to AdS-I and AdS-G; an effect absent in VD group.

In female groups, among unstimulated adipocytes only AdS-U of AD group triggered a marginal increase in CD36 mRNA level in VSMC (0.12 ± 0.01) compared to SD (0.00 ± 0.01) and VD (0.03 ± 0.02) groups (Figure 5-2.B). Exposure of adipocyte of all diet groups to insulin and/or glucose dramatically increases their capacity to induce CD36 mRNA level in VSMC. In the presence of AdS-I (1.27 ± 0.01 for SD; 1.25 ± 0.01 for VD; 1.39 ± 0.03 for AD) or AdS-G (0.21 ± 0.02 for SD; 0.21 ± 0.02 for VD; 0.44 ± 0.03 for AD), CD36 mRNA level remains higher in VSMC exposed to AdS from AD group compared to the two other groups. A cumulative effect was observed in the presence of AdS-IG for CD36 mRNA expression level in SD (1.83 ± 0.01), VD (1.90 ± 0.01) and, to a lesser extent, in AD (1.77 ± 0.03) groups. In this later condition, AdS from VD group had the superior cumulative effect.

4. VSMC apoptosis induction by AdS stimulation

VSMC apoptosis is one of the triggering events of atherogenesis. As a reference value, the basal level of FAS and Bax mRNA expression or caspase-3 activity from apoptotic pathways in VSMC maintained 24hr in DMEM culture media was set up at zero. In males, AdS-U from AD group significantly increased caspase-3 activity in VSMC ($3.65\mu\text{M}\pm 0.62$) compared to SD ($2.58\mu\text{M}\pm 0.32$) and VD ($2.48\mu\text{M}\pm 0.31$) groups (Figure 5-3.A). This diet effect in AD group was furthermore amplified with AdS-I ($7.09\mu\text{M}\pm 0.79$), AdS-G ($6.90\mu\text{M}\pm 0.64$) and AdS-IG ($5.53\mu\text{M}\pm 0.36$) compared to unstimulated cells (AdS-U). Insulin and/or glucose treated fat cells from SD and VD groups did not show any modulation of VSMC caspase-3 activity compared to AdS-U. The pro-apoptotic effect of AD-derived AdS was confirmed using Bax and FAS mRNA levels. Both of them were increased in VSMC exposed to AD-derived AdS (Table 5-4).

In females, AdS-U from AD group also increased VSMC caspase-3 activity ($3.33\mu\text{M}\pm 0.26$) compared to SD ($2.56\mu\text{M}\pm 0.34$) and VD ($2.00\mu\text{M}\pm 0.18$) groups

(Figure 5-3.B). However, in contrast with male supernatants, AdS-I and AdS-IG from VD group ($4.32\mu\text{M}\pm 0.54$; $5.19\mu\text{M}\pm 0.40$ respectively) preferentially increased caspase-3 activity compared to SD ($1.84\mu\text{M}\pm 0.20$; $2.64\mu\text{M}\pm 0.29$ respectively) and AD ($2.59\mu\text{M}\pm 0.19$; $3.09\mu\text{M}\pm 0.23$ respectively) groups. Bax and FAS mRNA levels were increased in corresponding groups (Table 5-4). Among untreated adipocytes, only AD female group increased FAS mRNA level (5.81 ± 0.70) in VSMC compared to SD (3.91 ± 1.10) and VD (2.51 ± 0.29).

5. Biochemical characteristics

To determine whether the differential effects of the AdS subtypes were attributable to variation in production of adipokines, we examined their leptin and adiponectin contents. These two adipokines are known for their important role in cellular glucose and lipid homeostasis. Their inverse interactions are linked to metabolic disorders and vascular alterations.

In males, comparable hyper-leptinemia was obtained in AdS-U from VD ($1.20\text{ng/ml}\pm 0.09$) and AD ($1.42\text{ng/ml}\pm 0.09$) groups compared to SD group ($0.33\text{ng/ml}\pm 0.03$) (Table 5-2). This hyper-leptinemia in HFD was further increased in response to insulin and/or glucose stimulations compared to unstimulated cells with maximum level reached with AdS-G. In females, leptin basal level in SD was markedly lower than in male cells supernatants. AdS-U contained 5 times more leptin in VD group ($0.34\text{ng/ml}\pm 0.03$) and 3 times more in AD group ($0.20\text{ng/ml}\pm 0.03$) compared to control ($0.06\text{ng/ml}\pm 0.004$). Insulin and/or glucose stimulations did not change leptin profile in AdS of SD group but increased it by 3 to 6 times in AdS of HFD groups compared to unstimulated cells (Table 5-2).

In parallel, adiponectin level was decreased in AdS-U of adipocytes from males under VD ($0.75\text{ng/ml}\pm 0.11$) and AD ($1.00\text{ng/ml}\pm 0.22$) compared to SD group ($2.75\text{ng/ml}\pm 0.46$) (Table 5-2). In SD male groups, adiponectin concentration was increased by 30% in AdS-I, by 70% in AdS-IG and by 96% in AdS-G compared to AdS-U. Insulin effect on adiponectin secretion was not significant in AD and VD group compared to unstimulated cells. However, it was increased by the addition of glucose (AdS-IG: 140% for VD and 127% for AD) or glucose alone (AdS-G: 350% for VD and 222% for AD) compared to unstimulated fat cells. Despite these differences, adiponectin concentration in HFD-derived AdS remains 30 to 70% higher in the corresponding control from SD group (Table 5-2).

In female groups, adiponectin level in AdS-U was more extensively decreased in AD group ($2.77\text{ng/ml}\pm 0.17$) compared to SD ($8.20\text{ng/ml}\pm 0.18$) and VD

(6.30ng/ml±0.15) groups (Table 5-2). Insulin treatment significantly increased adiponectin secretion in AdS-I by 5, 7 and 21% in SD, VD and AD groups respectively. Adipocytes from SD and VD groups enhanced adiponectin secretion by 14% and 25% after glucose treatment with or without insulin respectively. This increase reached 80% (AdS-IG) and 130% (AdS-G) with supernatants of AD fed mice-derived adipocytes compared to unstimulated cells. Finally, adiponectinemia in females remains up to 8 times higher when compared with corresponding male groups.

E. Discussion

The physiologic alterations of VSMC triggered by adipocyte conditioned media was recently addressed in human¹⁸. The novelty of this study is the evaluation of the impact of adipocyte conditioned media on VSMC in a model of obesity and T2D. Adipocytes were isolated from mice at different stages of metabolic alterations to condition VSMC culture medium. The protocol was set to reproduce a culture environment that mimics *in vivo* hyperglycemic and/or hyperinsulinic conditions. Adipocytes were stimulated with glucose, insulin or both of them. Their impact on VSMC was compared to unstimulated cells. The influence of dietary fat origin in the gender-specific modulation of the abdominal adipose cells that trigger VSMC alterations was also compared in this study.

Under nutritional conditions, mice illustrated 4 states of metabolic alterations: 1) an overweight stage without obvious metabolic alterations in VD female group, 2) a pre-diabetic stage with hyperinsulinemia in normo-glycemic AD female group 3) T2D in VD male group and 4) advanced T2D stage characterized by glucose intolerance and hyperinsulinemia in AD male group. AdS-induced VSMC physiologic modulations was gender dependent and influenced by the metabolic status of mice from which adipocytes were extracted.

Obesity-linked adipocyte alterations modulate VSMC proliferation and migration, two important cellular processes in atherogenesis. In the current study, we demonstrated that amplified VSMC proliferation was reduced by AdS of females under AD, an effect in contradiction with the decreased adiponectin production and an increased leptin level. Indeed, recent observations have shown that adiponectin deprivation result in neointima hyperplasia and leptin promotes a VSMC migration and proliferation^{19;20}. This unexpected antiproliferative effect was even more accentuated with AD male group adipocyte supernatants with their lower adiponectin levels. The rate of VSMC proliferation was similar between AdS-I of the SD group and AdS-U of the AD group known to be hyperinsulinemic. In majority of AdS-U, reduced number of VSMC was linked to increased mRNA expression level of apoptotic factors (Bax and FAS) and caspase-3 activity. Activation of the pro-apoptotic pathways was amplified by insulin ±

glucose stimulation of adipocytes from AD-fed males and VD-fed females, an effect contradicted by the increased proliferation of VSMC. These results suggest that the increased cell mortality is counterbalanced by an enhanced cell proliferation sustained by an increased secretion of leptin.

In contrast with males, the AdS-U of AD group-derived adipocytes in females inhibits less VSMC proliferation than SD group, an observation that could be linked to the reduced level of adiponectin in the AD supernatants. Hyperleptinemia associated with VD and AD in male and female derived AdS-G is associated to VSMC proliferation.

VSMC migration was statistically correlated with adiponectin and leptin changes in AdS. Equivalent number of cultured adipocytes is not transposed in the same adipokine secretion profile in all diet and gender groups. In male groups, a sharp decrease in adiponectin level coupled to hyper-leptinemia is correlated with increased VSMC migration in HFD groups. Insulin \pm glucose treatments further increase migratory potential of VSMC due possibly to higher secreted level of leptin in AdS. However, a lower migratory activity was observed in female groups most probably prevented by the adiponectin level that remains 4 times higher in female AdS compared to male groups under HFD²¹. AdS-I trigger migratory activity of VSMC in AD female group correlated with increased leptin secretion; a more moderated effect in VD group due to lesser leptin production by corresponding adipocytes.

In concordance with above discussed hypothesis, released FA could impact on glucose cell homeostasis and response to insulin. Insulin receptor (InsR) gene expression level in VSMC was decreased in the presence of insulin + glucose compared to unstimulated VSMC (Figure 5-6.C). This level was increased when cells are stimulated with glucose alone compared to insulin + glucose stimulated cells. In the presence of AdS treatment, InsR mRNA level increased in AdS-I and AdS-G from AD male group compared to both SD and VD groups (Figure 5-6.A). Saturated FA present at high concentrations in AD are known to block insulin activation²² and induce hyperleptinemia reported to impair the insulin signaling pathway²³. This was noticed in this study with the lack of insulin-induced adiponectin release in AdS in HFD groups compared to SD. To counteract these effects that reduce glucose uptake, VSMC increase their InsR expression. In contrast, AdS-U and AdS-G from VD female group decreased InsR mRNA (Figure 5-6.B). In this case, VD improves lipogenesis and lowers FA in AdS through its high level of oleic acid, known to trigger insulin sensitivity²⁴. Finally, differences in response to insulin stimulation between sexes have been reported showing that females are less sensitive to insulin than males²⁵. Thus, as shown, basic level of InsR mRNA in female VSMC were higher when treated with AdS.

Adipocytes used in this protocol were conditioned by food diets during 20 to 24 weeks. In contrast with females, males of HFD groups were hyperglycemic; a status usually associated with elevated advanced glycation end products (A-GEP). We hypothesized that A-GEP present in these adipocytes attenuate their insulin sensitivity and abolish insulin-activated lipogenesis²⁶. In this situation, adipocytes from HFD-groups had increased lipolysis activity which leads to increase of FA release that can trigger VSMC proliferation, migration and apoptosis^{3;27}.

Male and female mice from HFD groups had an increased serum concentration of FA compared to SD (data not shown); a profile directly linked to the activity of abdominal adipocytes. FA rich AdS from HFD-mice can stimulate PPAR γ in VSMC¹² triggering CD36 gene expression⁸. CD36 plays a key role in FA acid uptake and regulation *in vivo*²⁸. Adipokines were also reported to regulate CD36 expression²⁹. High leptin concentrations increase CD36 expression in VSMC³⁰ as in VSMC treated with AdS from HFD groups. Two distinctive phenotypes of adipocytes were found in the isolated abdominal white fat; hyperplastic with various stages of hypertrophy in VD-fed mice while mainly severely hypertrophic in AD-fed male mice. Dysfunctional hypertrophic adipocytes are associated with release of free fatty acids. CD36 expression increase FA accumulation in VSMC and induce apoptosis as shown in AD male group. In female AD group, the less advanced adipocyte hypertrophy combined with higher adiponectin level known to prevent FA accumulation³¹ may have contributed to limit apoptosis in VSMC exposed to AdS.

Among our experimental groups, the kinetic of metabolic disorders progression was clearly different between male and female mice. ER α , known to improve insulin sensitivity and glucose tolerance³² was pointed as a key player in this distinction. Its mRNA expression level was investigated and found to be decreased in HFD groups, even if it remains 4 times higher in females compared to males. Therefore in females, higher ER α expression level in adipocytes may have contributed in maintaining their sensitivity to insulin and/or glucose stimulations that inhibit lipolysis and reduce FA release. This could explain the reduced migratory activity and apoptosis of female AdS-stimulated VSMC.

Collectively, these data indicate that the development of adipocytes-induced VSMC alterations is sex related and linked to diet FA composition and degree of mice metabolic alterations. Such alterations modulate free FA and secrete cocktail of adipokines from the adipocytes and define VSMC proliferation, migration and sensitivity to apoptosis as well as their profile of response to insulin and glucose stimulation.

These results may contribute to better understand the complex interplay between abdominal white fat and distal vascular sites that lead to increased atherosclerotic events in obesity-linked metabolic syndrome.

F. Supplementary data

1. Immunocytochemical characterization of VSMC

VSMC were cultured and allowed to grow for 12hr on 8mm glass lamella. Following two washes in culture media DMEM, the cells were fixed using 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. The cells were then washed twice with PBS BSA1%, and incubated for 1hr in 2% normal goat serum to block unspecific protein. Cells were then washed twice and incubated with anti- α smooth muscle actin antibody (NeoMarker, USA) over night at 4°C. A control lamella was incubated with correspondent IgG to reveal unspecific labeling. To evaluate any endothelial cells contamination in our culture, a control lamella was incubated with anti-von willebrand antibody (Invitrogen, USA) for the same time.

After two wash in PBS BSA 1% and further incubated with affinity purified Alexa 488 conjugated antirabbit antibody (Invitrogen, USA) for one hour at room temperature, fluorescent specimens were visualized under a microscope and photographed (Figure 5-4). As a control for unspecific labeling of the secondary antibody, VSMC were treated with Alexa 488 for one hour at room temperature.

2. Gene expression

Since VSMC metabolism depend on glucose, we evaluated InsR gene expression responsible of the stimulation of glucose uptake. In our control VSMC, only insulin and glucose stimulation significantly reduce InsR expression level (0.55 ± 0.02) compared to unstimulated (1.01 ± 0.11) and insulin (0.85 ± 0.11) or glucose (1.22 ± 0.25) stimulated cells (Figure 5-6.A). In AdS-treated cells, unstimulated adipocytes from males group don't induce any significant modulation of InsR mRNA in VSMC compared to control (Figure 5-6.B). In contrast, unstimulated adipocytes from female decrease InsR mRNA level in VD group (0.58 ± 0.09), and increase it in SD (1.47 ± 0.12) and AD (1.43 ± 0.12) groups compared to control (Figure 5-6.C). In response to insulin or glucose stimulation adipocytes from SD male group significantly decrease the InsR expression level by 30 and 75% respectively in VSMC compared to unstimulated cells. In contrast, adipocytes from VD and AD male group don't influence InsR gene expression in VSMC compared to unstimulated condition. On the other hand, insulin + glucose stimulation don't affect

InsR gene expression in SD male group compared to unstimulated adipocytes. Further, while adipocytes from AD male groups slightly increase InsR mRNA in VSMC compared to unstimulated cells, those from VD group markedly increase InsR expression in VSMC (1.25 ± 0.11) in response to insulin + glucose stimulation compared to the other culture conditions and to SD derived AdS (Figure 5-6.B).

In females, adipocytes from SD and AD groups don't affect InsR gene expression in VSMC under any stimulation condition. In contrast, adipocytes from VD group significantly increase InsR mRNA level in SMC compared to unstimulated cells in response to insulin (1.33 ± 0.14) or insulin + glucose (2.13 ± 0.24) stimulations. Finally, as with unstimulated adipocytes, glucose stimulation showed a diet effect in female VD group that decrease InsR mRNA level (0.72 ± 0.13) compared to SD and AD (Figure 5-6.C).

G. Appendix

Abbreviation

AD Animal HFD

AdS Adipocytes Supernatants

AdS-G Glucose stimulated Adipocytes Supernatants

AdS-I Insulin stimulated Adipocytes Supernatants

AdS-IG Insulin and Glucose stimulated Adipocytes Supernatants

AdS-U Unstimulated Adipocytes Supernatants

DMEM Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium

EC Endothelial Cells

FAS Fatty Acid Synthase

FGF Fibroblast Growth Factor

HFD High Fat Diet

InsR Insulin Receptor

LDL Low Density Lipoprotein

oxLDL oxidized LDL

PPAR Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

SD Standard Diet

T2D Type 2 Diabetes

VD Vegetal HFD

VSMC Vascular Smooth Muscle Cells

Authors' contributions:

SEA carried out the physiological follow up of the mice, biochemical assays, cell culture and molecular and biochemical studies. The drafting of the manuscript were completed by SEA. IC as well as JFT participated in the design and the coordination of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing of interest

Neither of the authors has any potential benefits or conflicts of interest to disclose.

Funding

This study was financed by a grant from the fondation des maladies du Coeur du Québec and the Montreal Heart Institute foundation.

H. References

1. Casey RG, Gang C, Joyce M, Bouchier-Hayes DJ: Taurine attenuates acute hyperglycaemia-induced endothelial cell apoptosis, leucocyte-endothelial cell interactions and cardiac dysfunction. *J Vasc Res* 44:31-39, 2007
2. Hennig B, Toborek M, McClain CJ: High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 20:97-105, 2001
3. Rodriguez-Lee M, Ostergren-Lunden G, Wallin B, Moses J, Bondjers G, Camejo G: Fatty acids cause alterations of human arterial smooth muscle cell proteoglycans that increase the affinity for low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:130-135, 2006
4. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999
5. Mulvihill ER, Jaeger J, Sengupta R, Ruzzo WL, Reimer C, Lukito S, Schwartz SM: Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1283-1289, 2004
6. Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, Hindkjaer J, Kassem M, Falk E: Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2696-2702, 2006

7. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA: Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13531-13536, 2003
8. Lim HJ, Lee S, Lee KS, Park JH, Jang Y, Lee EJ, Park HY: PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80:165-174, 2006
9. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP: Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34:2-11, 2008
10. Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115:911-919; quiz 920, 2005
11. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003
12. Sharma AM, Staels B: Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:386-395, 2007
13. Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, Jou W, Pack S, Asghar Z, Wheeler MB, LeRoith D: Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. *Endocrinology* 146:4024-4035, 2005
14. Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ: Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E187-192, 2002
15. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT: Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 46:1369-1379, 2005
16. El Akoum S, Lamontagne V, Cloutier I, Tanguay JF. Nature of Fatty Acids in High Fat Diets Differentially Delineates Obesity-Linked Metabolic Syndrome Components in Male and Female C57BL/6J Mice. *Diabetol Metab Syndr*. Dec 14;3(1):34
17. Ray JL, Leach R, Herbert JM, Benson M: Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. *Methods Cell Sci* 23:185-188, 2001
18. Lamers D, Schlich R, Greulich S, Sasson S, Sell H, Eckel J: Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signaling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*

19. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866, 2002
20. Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M: Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci* 47:141-150, 2001
21. Asterholm IW, Scherer PE: Enhanced metabolic flexibility associated with elevated adiponectin levels. *Am J Pathol* 176:1364-1376
22. Chavez JA, Summers SA: Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 419:101-109, 2003
23. Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C, Djiane J, Tome D, Taouis M: In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 242:59-66, 2005
24. Soriguer F, Esteva I, Rojo-Martinez G, Ruiz de Adana MS, Dobarganes MC, Garcia-Almeida JM, Tinahones F, Beltran M, Gonzalez-Romero S, Olveira G, Gomez-Zumaquero JM: Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur J Endocrinol* 150:33-39, 2004
25. Vital P, Larrieta E, Hiriart M: Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol* 190:425-432, 2006
26. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y: Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract* 76:236-244, 2007
27. Artwohl M, Lindenmair A, Roden M, Waldhausl WK, Freudenthaler A, Klosner G, Ilhan A, Luger A, Baumgartner-Parzer SM: Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure. *Atherosclerosis* 202:351-362, 2009
28. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274:19055-19062, 1999
29. Lee TS, Lin CY, Tsai JY, Wu YL, Su KH, Lu KY, Hsiao SH, Pan CC, Kou YR, Hsu YP, Ho LT: Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger

receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life Sci* 84:97-104, 2009

30. Konstantinidis D, Paletas K, Koliakos G, Kaloyianni M: Signaling Components Involved in Leptin-Induced Amplification of the Atherosclerosis-Related Properties of Human Monocytes. *J Vasc Res* 46:199-208, 2008

31. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057-1063, 2001

32. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P: Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150:2109-2117, 2009.

I. Tables and Figures

Table 5-1. *In vivo* mice parameters. Weight gain, glycemic parameters and adipokines secretion profile evaluated in male and female sera mice. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. SD; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs. VD.

Table 5-2. AdS concentrations of adiponectin and leptin after 24hr of culture. For a same diet: *P<0.05 vs AdS-U; **P<0.05 vs. AdS-I; ***P<0.05 vs. AdS-IG. For a same stimulation: #P<0.05 vs. SD; ## P<0.05 vs. VD.

Table 5-3 Specific primers sequence.

Table 5-4 Bax and FAS mRNA expression levels in AdS-treated VSMC in male and female groups. For a same diet: *P<0.05 vs AdS-U; **P<0.05 vs. AdS-I; ***P<0.05 vs. AdS-IG. For a same stimulation: #P<0.05 vs. SD; ##P<0.05 vs. VD.

Figure 5-1. VSMC proliferation and migration rate after 24hr of treatment with AdS of male (A & C respectively) and female (B & D respectively) mice. For a same diet: *P<0.05 vs AdS-U; **P<0.05 vs. AdS-I; ***P<0.05 vs. AdS-IG. For a same stimulation: #P<0.05 vs. SD; ##P<0.05 vs. VD.

Figure 5-2. CD36 scavenger receptor mRNA expression level in AdS-treated VSMC in male (A) and female (B) groupings. For a same diet: *P<0.05 vs AdS-U; **P<0.05 vs.

AdS-I; ***P<0.05 vs. AdS-IG. For a same stimulation: #P<0.05 vs. SD; ##P<0.05 vs. VD.

Figure 5-3. Caspase-3 activity in AdS-treated VSMC in male (A) and female (B) groups. For a same diet: *P<0.05 vs AdS-U; **P<0.05 vs. AdS-I; ***P<0.05 vs. AdS-IG. For a same stimulation: #P<0.05 vs. SD; ##P<0.05 vs. VD.

Figure 5-4. Immunocytochemical characterization of VSMC. VSMC fluorescent specimens were visualized under a microscope and photographed after incubation with anti- α smooth muscle actin antibody (A) or correspondent IgG (B) then Alexa 488 conjugated anti-rabbit antibody. To evaluate any endothelial cells contamination in our culture, a control lamella was incubated with anti-von willebrand antibody (C) then with Alexa 488 conjugated anti-rabbit antibody. A final control for the unspecific labeling of the secondary antibody was performed by incubating VSMC with Alexa 488 (D).

Figure 5-5. VSMC control treatment. Incubation of VSMC with insulin or glucose for 24 hours significantly increases the proliferative (A) and migratory (B) potential of these cells. These results are expressed as percentage of proliferation rate of unstimulated cells (\emptyset). On the other hand, in order to detect the potential of VSMC to uptake fatty acids after AdS treatment, CD36 scavenger receptor mRNA expression level was evaluated in untreated cells (\emptyset) and after 24h of incubation with insulin and/or glucose (C). Glucose and insulin stimulations increase CD36 expression level in VSMC compared to unstimulated cells. All results were comparable with VSMC from male and female mice. +P<0.05 vs unstimulated cells (\emptyset), ++P<0.01 vs insulin-stimulated cells, +++P<0.01 vs insulin + glucose (Ins/Glu)-stimulated cells.

Figure 5-6 InsR gene expression is up-regulated with AdS of stimulated adipocytes from AD-fed males (A) and down-regulated with AdS of unstimulated and glucose stimulated adipocytes of VD-fed females (B). The basic InsR VSMC expression level (\emptyset) is reported as 100% expression gene level (C). Insulin + glucose stimulation decrease InsR mRNA level without any significant modulation of this parameter after insulin or glucose VSMC treatment (C). *P<0.05 vs AdS-U; **P<0.05 vs. AdS-I; ***P<0.05 vs. AdS-IG. For a same stimulation: #P<0.05 vs. SD; ##P<0.05 vs. VD. +P<0.05 vs unstimulated cells (\emptyset), ++P<0.01 vs insulin-stimulated cells, +++P<0.01 vs insulin + glucose (Ins/Glu)-stimulated cells

Table 5- 1 *In vivo* mice parameters

	Males			Females		
	SD	VD	AD	SD	VD	AD
Weight gain (g)	11.8 ± 0.9	28.1 ± 1.3 ^{***}	23.9 ± 1.6 ^{***}	5.9 ± 1.2	18.7 ± 0.8 ^{***}	22.6 ± 1.2 ^{***}
Fasting glycæmia (mM)	4.0 ± 0.2	9.0 ± 0.6 ^{***}	8.3 ± 0.6 ^{***}	4.0 ± 0.5	6.3 ± 0.3	5.2 ± 0.3
Fasting insulinemia (µg/ml)	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1 ^{**#}	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1 ^{**###}
Fasting leptin level (µg/ml)	0.06 ± 0.01	0.58 ± 0.05 ^{***}	0.8 ± 0.07 ^{***##}	0.04 ± 0.01	0.34 ± 0.06 ^{***}	0.9 ± 0.07 ^{***###}
Fasting adiponectin level (µg/ml)	1.97 ± 0.15	1.40 ± 0.12 ^{**}	1.24 ± 0.15 ^{***}	9.55 ± 0.72	8.97 ± 0.67	8.76 ± 0.52
Leptin mRNA level in visceral abdominal adipose tissue	0.78 ± 0.18	3.93 ± 0.26 ^{***}	5.39 ± 0.64 ^{***}	0.88 ± 0.22	2.49 ± 0.34 [*]	5.37 ± 0.43 ^{***#}
Adiponectin mRNA level in visceral abdominal adipose tissue	1.24 ± 0.08	0.53 ± 0.06 ^{***}	0.61 ± 0.06 ^{***}	15.67 ± 0.51	4.53 ± 0.45 ^{***}	2.63 ± 0.17 ^{***#}

Table 5- 2 AdS adiponectin & leptin secretion level

Sex groups	Diet groups	Adipocytes' supernatants	Adiponectin level (ng/ml) ± SEM	Leptin level (ng/ml) ± SEM
Males	SD	AdS-U	2.75±0.46	0.33±0.03
		AdS-I	3.61±0.21 *	0.47±0.04
		AdS-IG	4.69±0.04 * **	0.55±0.03 *
		AdS-G	5.40±0.51 * **	0.77±0.05 * ** ***
	VD	AdS-U	0.75±0.11 #	1.20±0.09 #
		AdS-I	0.82±0.27 #	1.78±0.05 * #
		AdS-IG	1.79±0.29 * ** #	2.25±0.16 * ** #
		AdS-G	3.36±0.62 * ** *** #	2.74±0.09 * ** *** #
	AD	AdS-U	1.00±0.22 #	1.42±0.09 # ##
		AdS-I	1.43±0.14 # ##	1.81±0.03 * #
		AdS-IG	2.27±0.39 * ** #	2.18±0.07 * ** #
		AdS-G	3.22±0.38 * ** *** #	2.65±0.04 * ** *** #
Females	SD	AdS-U	8.2±0.18	0.06±0.004
		AdS-I	8.63±0.11 *	0.06±0.004
		AdS-IG	9.40±0.11 * **	0.07±0.002
		AdS-G	9.91±0.07 * ** ***	0.08±0.002
	VD	AdS-U	6.29±0.15 #	0.34±0.03 #
		AdS-I	6.78±0.14 * #	0.52±0.09 * #
		AdS-IG	7.19±0.17 * ** #	0.98±0.05 * ** #
		AdS-G	7.91±0.54 * ** *** #	1.23±0.04 * ** *** #
	AD	AdS-U	2.77±0.17 # ##	0.20±0.03 #
		AdS-I	3.36±0.30 * # ##	0.85±0.06 * # ##
		AdS-IG	4.98±0.41 * ** # ##	1.05±0.03 * ** #
		AdS-G	6.39±0.49 * ** *** # ##	1.28±0.08 * ** #

Table 5- 3 Specific primers sequence

Gene	Forward primer	Reverse primer
CD36	5'-GCC AAG CTA TTG CGA CAT GA-3'	5'-AAG GCA TTG GCT GGA AGA AC-3'
Insulin receptor	5'-CAG AGA AGG TCT CTC GGA CT-3'	5'-TGG AGA GGT AGA TGA GCC GC-3'
Bax	5'-CGG CGA ATT GGA GAT GAA CTG-3'	5'-GCA AAG TAG AAG AGG GCA ACC-3'
FAS	5'-GCT GCA GAC ATG CTG TGG ATC-3'	5'-TCA CAG CCA GGA GAA TCG CAG-3'
Cyclophilin-A	5'-CCG ATG ACG AGC CCT TGG-3'	5'-GCC GCC AGT GCC ATT ATG-3'

Table 5- 4 Bax and FAS mRNA expression levels

Sex groups	Diet groups	Adipocytes' supernatants	Bax mRNA level \pm SEM	FAS mRNA level \pm SEM
Males	SD	AdS-U	0.77 \pm 0.20	0.79 \pm 0.12
		AdS-I	0.54 \pm 0.11	0.82 \pm 0.13
		AdS-IG	0.49 \pm 0.09	0.72 \pm 0.20
		AdS-G	0.72 \pm 0.09	1.12 \pm 0.10
	VD	AdS-U	0.94 \pm 0.20	0.74 \pm 0.08
		AdS-I	0.68 \pm 0.13	1.17 \pm 0.10
		AdS-IG	0.56 \pm 0.17	0.71 \pm 0.10 **
		AdS-G	0.63 \pm 0.10	1.05 \pm 0.16
	AD	AdS-U	0.91 \pm 0.22	1.32 \pm 0.26 ##
		AdS-I	0.95 \pm 0.09 #	3.05 \pm 0.06 * # ##
		AdS-IG	2.16 \pm 0.08 * ** # ##	2.95 \pm 0.29 * # ##
		AdS-G	2.87 \pm 0.53 * ** # ##	2.27 \pm 0.16 * # ##
Females	SD	AdS-U	2.00 \pm 0.20	3.91 \pm 1.10
		AdS-I	1.40 \pm 0.30	2.10 \pm 0.40
		AdS-IG	1.90 \pm 0.11	4.10 \pm 0.40 **
		AdS-G	2.30 \pm 0.20 **	4.27 \pm 0.30 **
	VD	AdS-U	2.10 \pm 0.50	2.51 \pm 0.29
		AdS-I	2.00 \pm 0.30	8.31 \pm 1.36 * #
		AdS-IG	3.20 \pm 0.40 * ** #	10.4 \pm 0.10 * #
		AdS-G	1.40 \pm 0.20 *** #	4.61 \pm 0.77 ** ***
	AD	AdS-U	1.80 \pm 0.20	5.81 \pm 0.70 # ##
		AdS-I	1.30 \pm 0.10	3.96 \pm 0.49 * ##
		AdS-IG	1.90 \pm 0.30 ##	5.22 \pm 0.40 ##
		AdS-G	1.90 \pm 0.40	2.87 \pm 0.12 * *** #

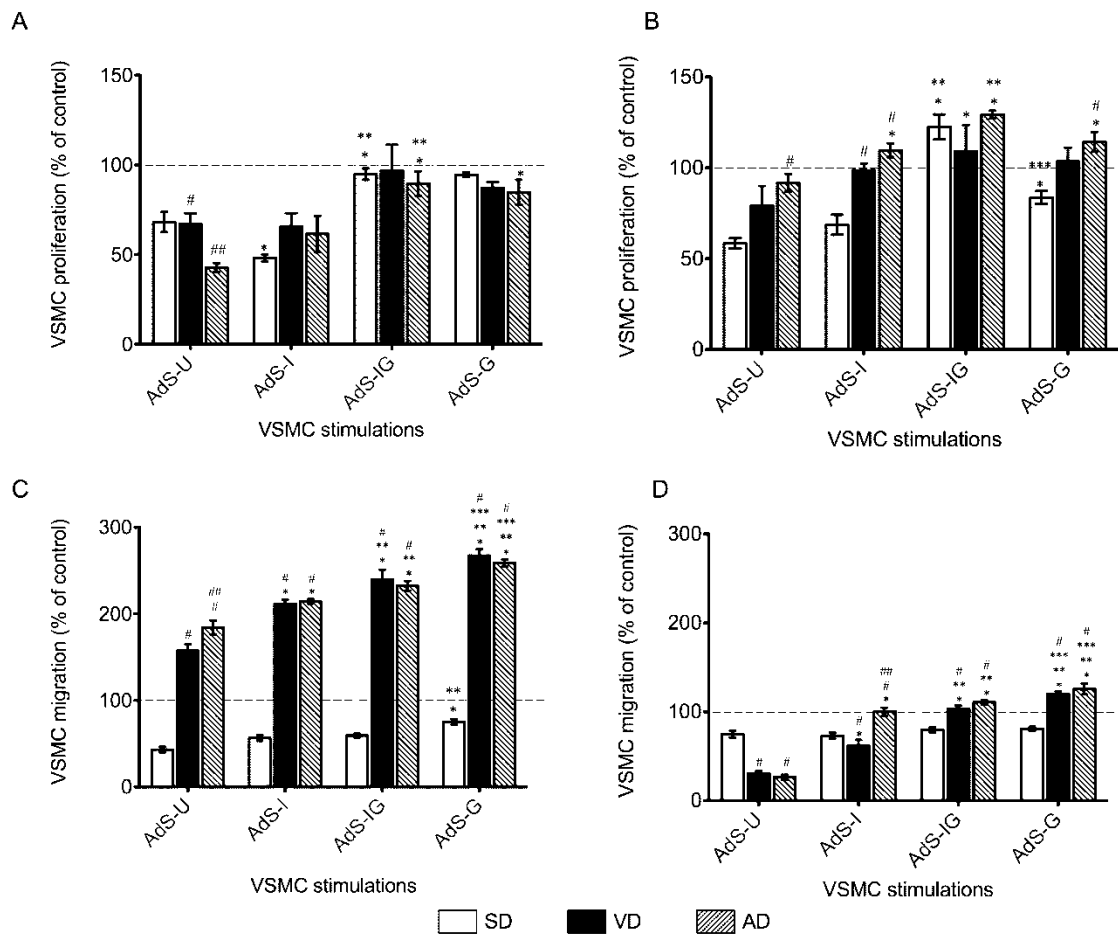


Figure 5- 1 VSMC proliferation and migration

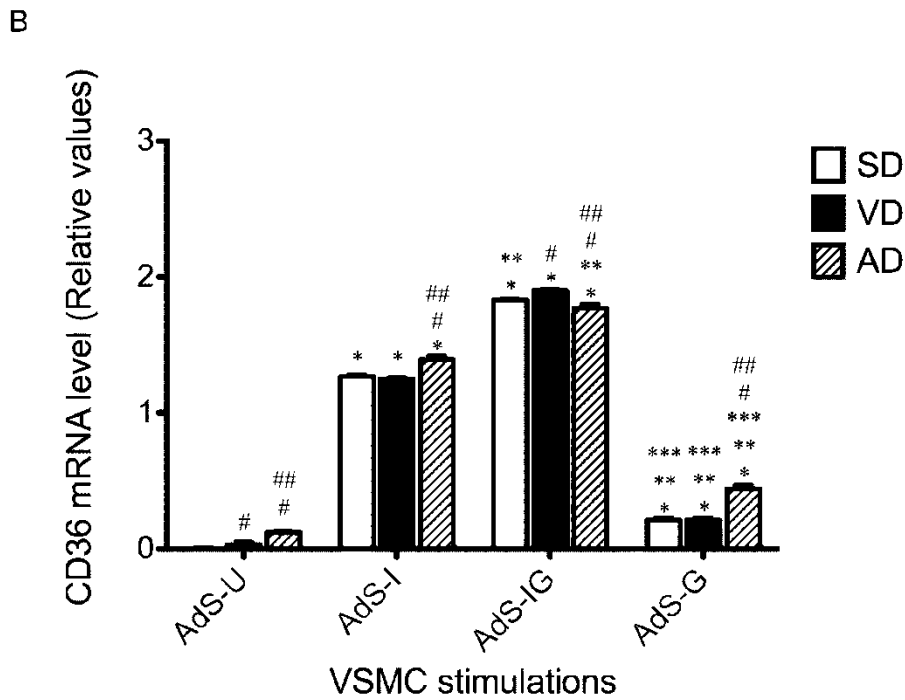
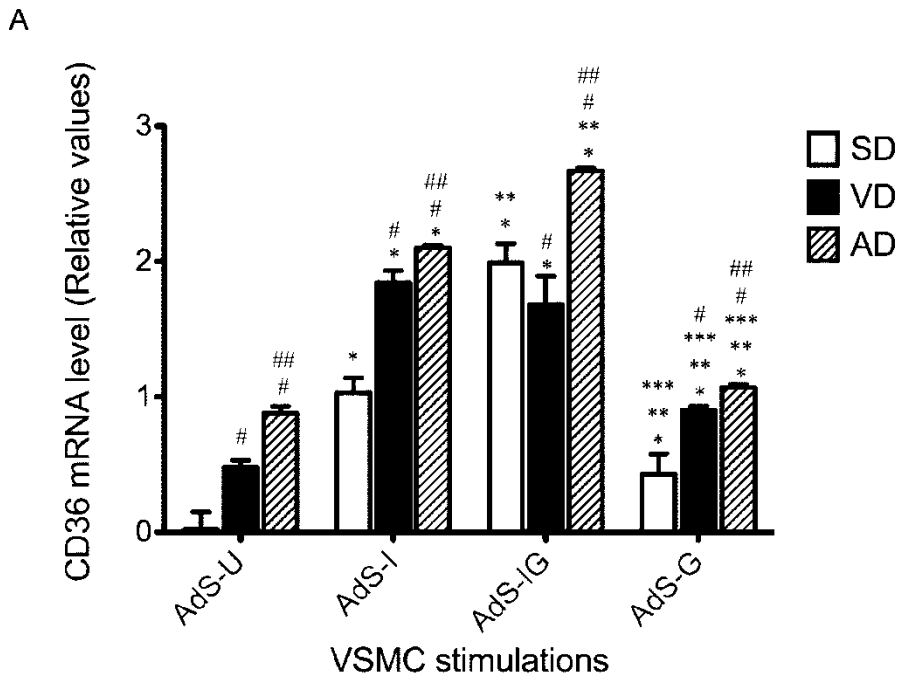


Figure 5- 2 CD36 scavenger receptor mRNA expression level in AdS-treated VSMC

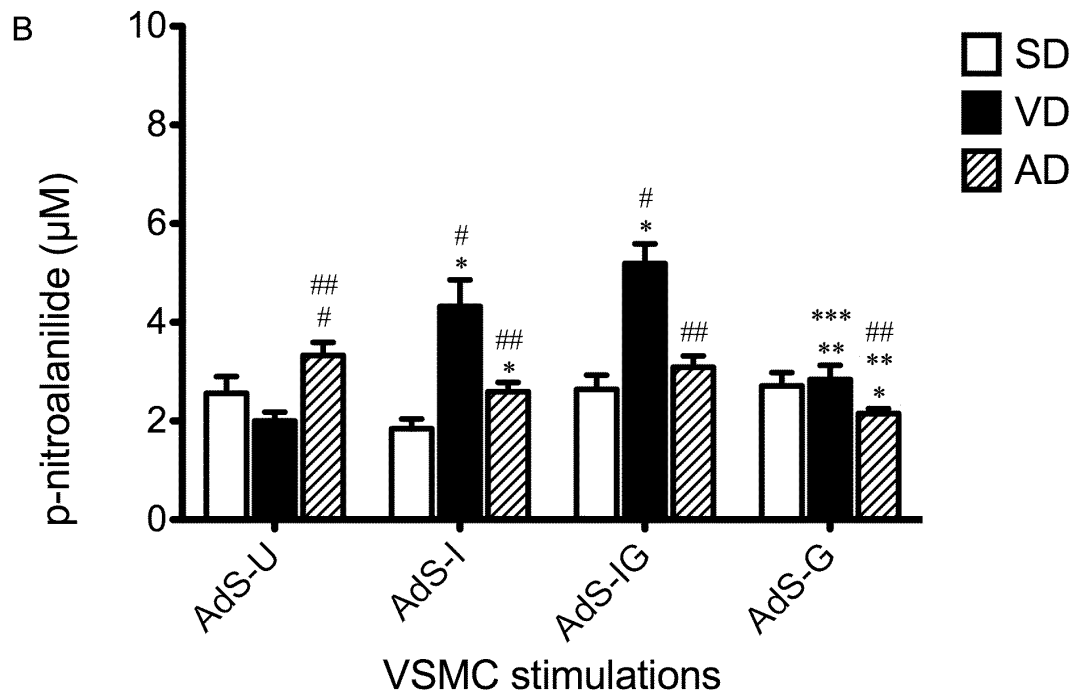
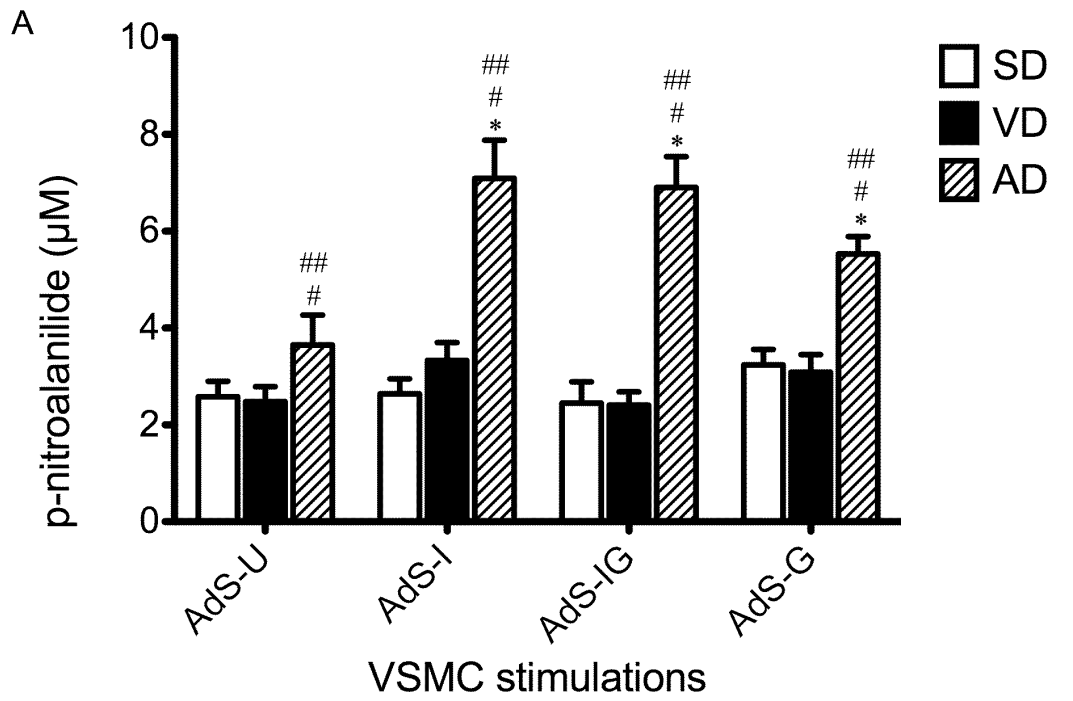


Figure 5- 3 Caspase-3 activity in AdS-treated VSMC reflected by the p-nitroalanilide concentration

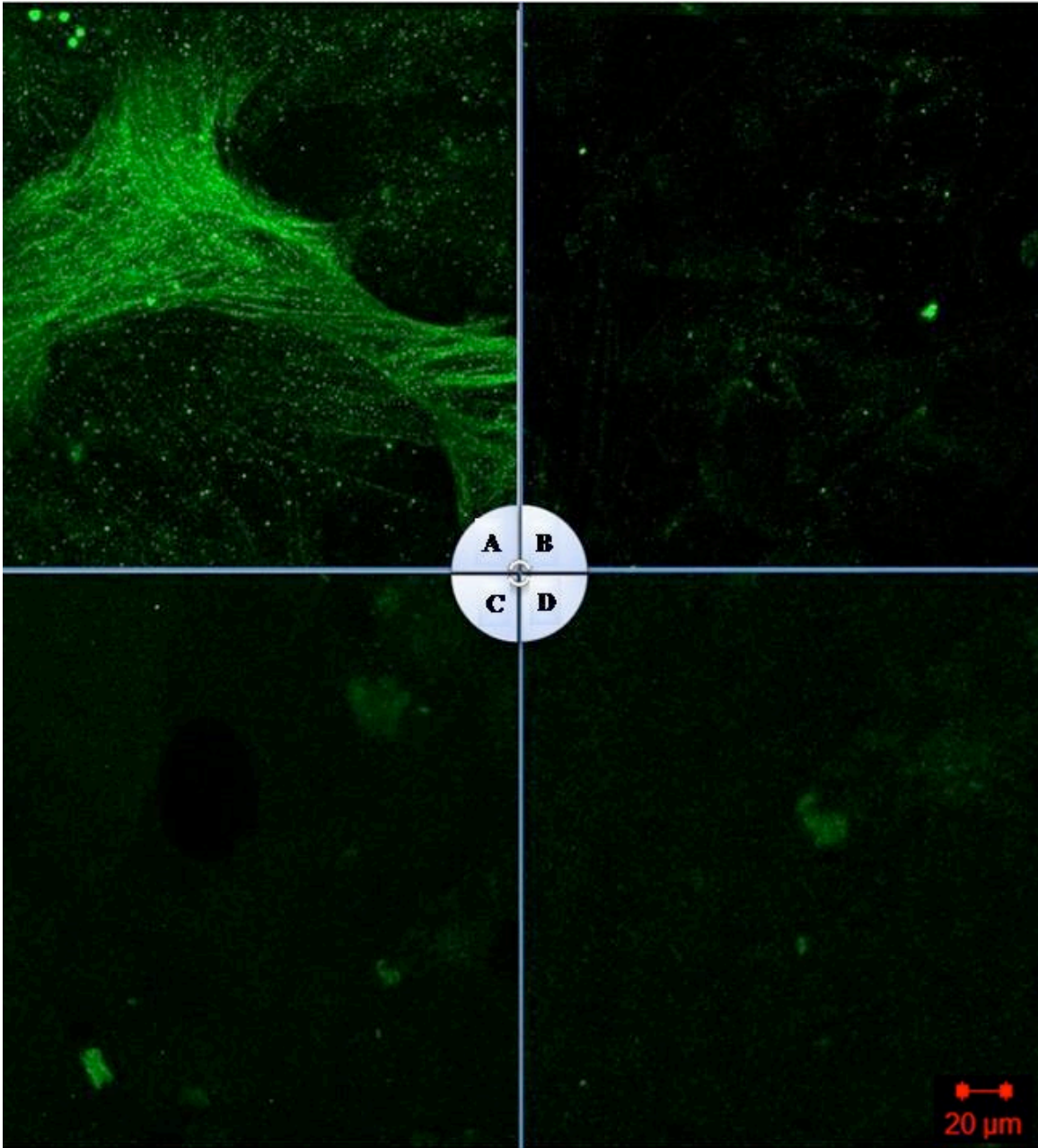


Figure 5- 4 VSMC Immunocytochemical characterization

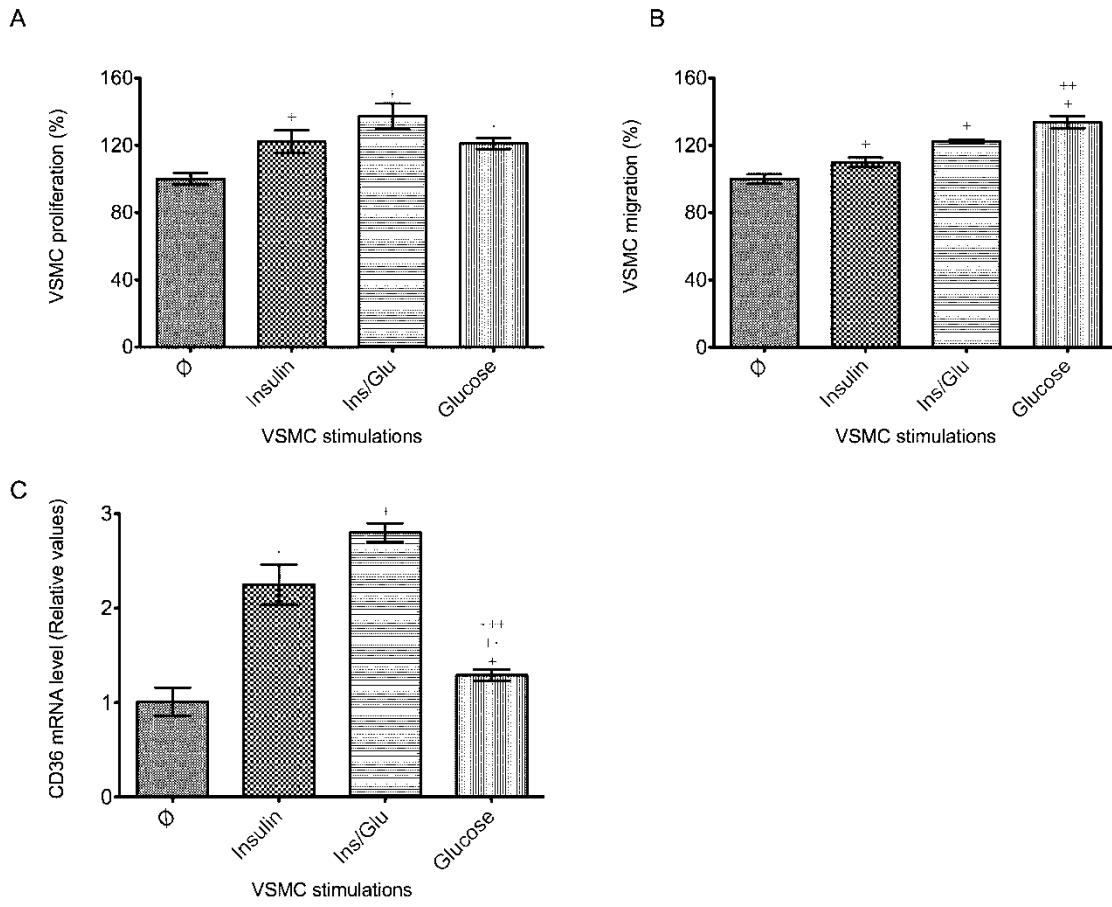


Figure 5- 5 VSMC control treatments

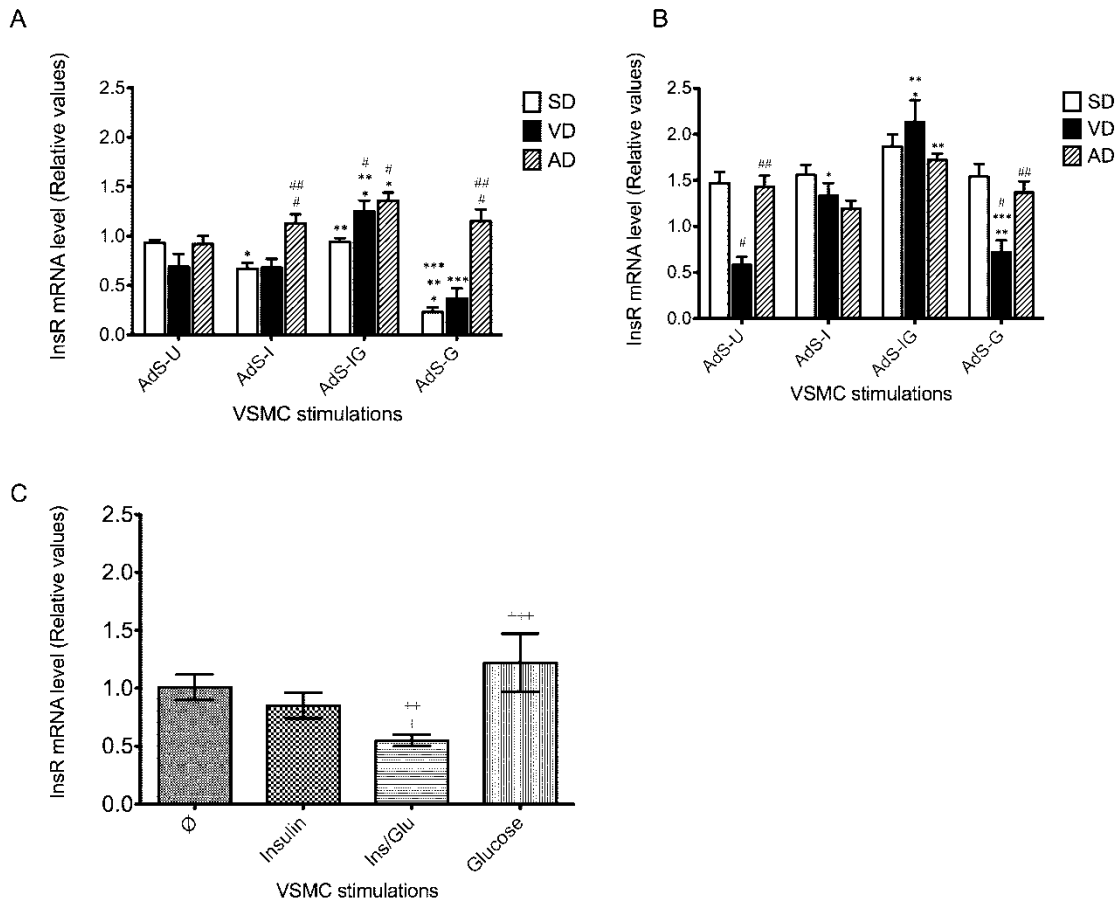
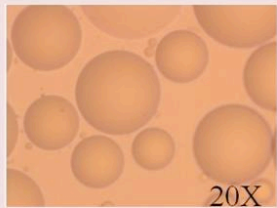
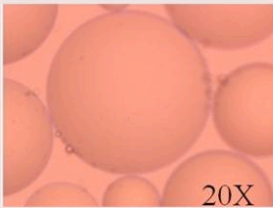
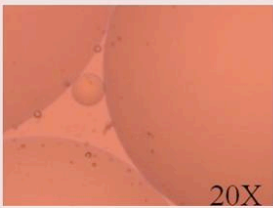
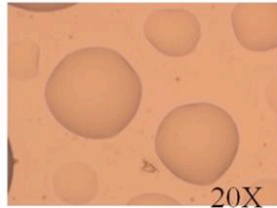
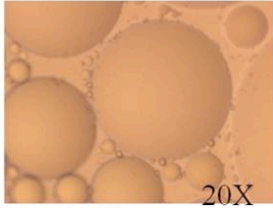
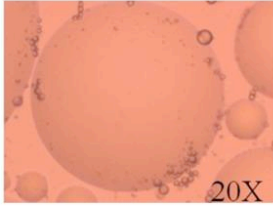


Figure 5- 6 VSMC InsR mRNA expression level

VI. Résultats supplémentaires

Au sacrifice, le tissu adipeux blanc des souris fût extrait de la partie viscérale de l'abdomen et digéré par la collagénase pour en extraire les adipocytes. Ceux là ont été mis en culture pour conditionner le milieu de culture des CML. L'observation par microscopie des adipocytes extraits des différents groupes de souris a révélé que la nature du gras des diètes modulait de façon importante la morphologie et la physiologie de ces cellules. Une hypertrophie des adipocytes fût ainsi constatée dans les tissus du groupe AD en comparaison avec les deux autres groupes. Cependant, dans le groupe DV c'est l'hyperplasie qui était prédominante avec une augmentation de la taille par rapport au groupe DS.

Tableau 6- 1 Adipocytes extraits de souris mâles et femelles tels que visualisés au microscope

	Diète standard	Diète enrichie en gras végétal	Diète enrichie en gras animal
Males	 20X	 20X	 20X
Femelles	 20X	 20X	 20X

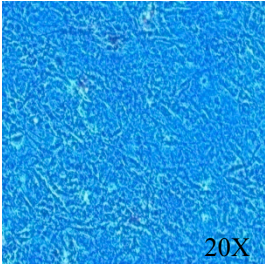
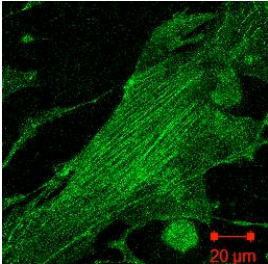
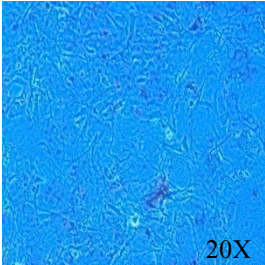
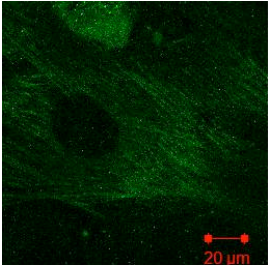
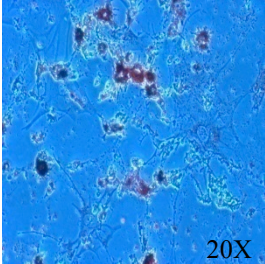
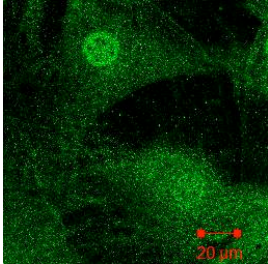
Après 20 à 24 semaines de diète les adipocytes du tissu adipeux viscéral de l'abdomen ont été prélevés des souris faisant partie des trois groupes de diètes : normale (DN), enrichie en graisses végétales (DV) ou animales (DA). Après la mise en culture avec ou sans insuline et/ou glucose des adipocytes isolés, l'impact de leurs surnageants sur les CML a été évalué. Après 24 heures de stimulation avec les surnageants des adipocytes, une évaluation de la capture lipidique des CML a été réalisée par une coloration à l'huile rouge (Oil Red O) et une étude de leur morphologie fut effectuée en microscopie confocale après le marquage de leurs filaments d'actine.

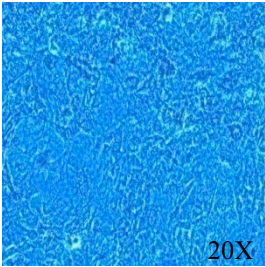
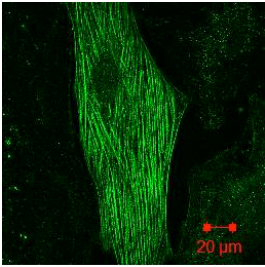
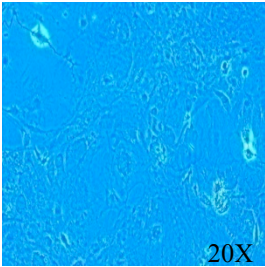
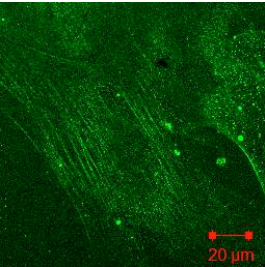
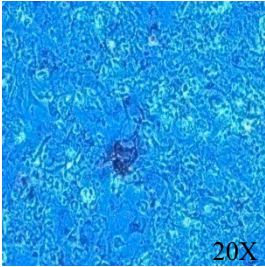
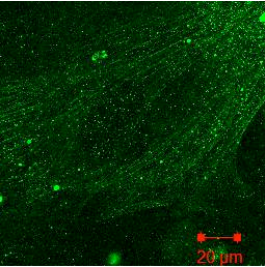
Ci-dessous sont présentés les résultats obtenus avec les surnageants des adipocytes non stimulés des 3 groupes de diètes chez les mâles et les femelles en comparaison avec le groupe contrôle qui représente les CML à l'état natif dans leur milieu de culture (Figure 5-4). Les surnageants des adipocytes stimulés avec insuline et/ou glucose ont induit les mêmes altérations observées avec les adipocytes non traités.

Les surnageants des adipocytes non stimulés des mâles sous DV et DA augmentent l'incorporation des AG dans les CML en comparaison avec les CML contrôles et traités avec les surnageants des adipocytes du groupe DN des mâles. À cela est associée une désorganisation des filaments d'actine dans les groupes sous diètes riches en gras. D'autre part, les surnageants des adipocytes femelles DV et DA mènent à une désorganisation des filaments d'actines mais seuls les adipocytes du groupe DA semblent induire une accumulation d'AG dans les CML.

Ces altérations morphologiques des CML sont corrélées aux dysfonctions fonctionnelles de ces cellules et associées aux changements du profil de sécrétion des adipokines révélés dans les surnageants des adipocytes mis en culture.

Tableau 6- 2 Cellules musculaires lisses après traitement avec les surnageants des adipocytes

Surnageant adipocytaire du groupe	Marquage Oil Red O	Marquage des filaments alpha d'actines des CML
DS des souris mâles		
DV des souris mâles		
DA des souris mâles		

<p>DS des souris femelles</p>		
<p>DV des souris femelles</p>		
<p>DA des souris femelles</p>		

Chapitre IV. DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSIONS

VII. Choix du modèle animal

Afin d'étudier l'étiologie des altérations métaboliques menant au diabète, la mise en place d'un modèle expérimental caractéristique de la pathologie humaine est depuis toujours une préoccupation capitale. Un tel modèle représenterait une voie d'accès à la compréhension de la genèse et des complications de cette pathologie.

Au cours des dernières années, différents modèles animaux d'altérations métaboliques et de diabète, notamment chez les rongeurs, ont été caractérisés. L'induction du diabète peut se faire par chirurgie (pancréatectomie), par injection de substances chimiques toxiques pour les cellules β , telle la streptozotocine, par inoculation de virus qui altèrent les cellules β (virus *Encephalomyocarditis*), ou par génétique (rat Zucker, rat B/B *Wistar Bio Breeding*, souris NOD *Non Obese Diabetic Mice*, souris ob/ob, souris obèse "yellow mice", souris NZO *New Zealand Obese*, souris diabétique non obèses KK) (467-472). Toutefois, ces modèles modélisent plus le diabète de type 1 insulino-dépendant lié à une dysfonction pancréatique ou les caractéristiques d'un DT2 liées à une dysfonction génétique.

Cependant, plus de 90% des cas de diabète chez l'homme sont représentés par le DT2 lié à des altérations métaboliques. Ce diabète non insulino-dépendant est lié, dans la majorité des cas, à l'alimentation, à la sédentarité et à l'obésité. En effet, les habitudes alimentaires, influencées par la socialisation humaine et l'industrialisation des sociétés, ont été modifiées par une alimentation riche en matières grasses. De plus, l'adoption d'un style de vie « aisée » caractérisé par les conditions du travail et le manque d'exercice est à l'origine de l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans la plupart des régions du monde. Ainsi le monde est passé d'une société active privilégiant une alimentation hypocalorique vers une société passive couplée à un apport énergétique hypercalorique. Ce développement de la société qui a débuté avec la révolution industrielle, a augmenté la prévalence de diverses altérations comme l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires (473). Pour bien comprendre les phénomènes physiopathologiques qui caractérisent les tendances de la consommation alimentaire dans le monde d'aujourd'hui, le choix d'un modèle caractéristique de l'évolution humaine était primordial. L'espèce animale la plus représentative des altérations métaboliques et du DT2 chez l'homme liés à l'alimentation n'est pas encore connue. Cependant, le choix de la souris C57BL/6J comme modèle expérimental de notre projet reposait sur divers critères. Dans un premier lieu, le métabolisme de cet animal est bien connu, étant donné que la plupart des travaux développés dans ce domaine se font chez cette souris. Également, le régime alimentaire de la souris, comparable à celui de l'homme « d'avant la révolution industrielle », est un régime omnivore à dominance végétarienne composé

principalement de graines, de légumes, de fruits et d'un peu de viande ou de fromage (474; 475). De plus, les aliments pour les souris de compositions ajustables selon les besoins étaient disponibles sur le marché. Nous avons ainsi à notre disposition une alimentation dont la composition fut établie proche de celle consommée par l'homme des pays industrialisés et associée à l'obésité et au DT2 (240; 473; 476). Finalement, le métabolisme de la souris comprend une étape qui passe par la rate, correspondant à celui de l'homme. Cet organe est absent chez d'autres rongeurs comme le rat.

Par ailleurs, les souris sont génétiquement proches de l'homme à 98% (477) et leur génome est maintenant connu à plus de 90%. Ainsi, elles partagent plusieurs aspects physiologiques et métaboliques communs liés au développement, à la physiologie et à la génétique des maladies qui peuvent être corrélés entre eux. De plus, les souris transgéniques, surtout sur fond de C57BL/6J, sont largement utilisées pour étudier les processus physiopathologiques du diabète et des altérations métaboliques de l'homme du fait de l'homologie entre les gènes humains et murins. Ainsi, la corrélation des résultats de ce projet avec ceux des études employant des souris transgéniques pour expliquer les processus mis en jeu dans notre modèle serait plus facile en minimisant la variabilité sur fond génétique.

Ceci dit, il existe des modèles animaux d'altérations métaboliques et d'obésité basés sur l'induction de la maladie par un régime alimentaire hypercalorique. Parmi eux, nous pouvons citer la souris Spiny chez qui un régime riche en sucrose ou en lipide provoque une réduction de la lipogenèse et entraîne une hyperlipidémie, une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie (472). De plus, l'équipe de Gallou-Kabani et coll. a mis en place un modèle d'altérations métaboliques chez les souris C57BL/6J et A/J en partant d'une diète enrichie en gras (478). Cependant, l'originalité de notre étude réside dans l'utilisation de deux diètes enrichies en matières grasses de nature différente l'une végétale (DV) et l'autre animale (DA) en comparaison avec une diète standard (DS) communément utilisée en laboratoire pour les souris. Pour faciliter la rédaction, les termes groupe DV, groupe DA et groupe DS seront employés pour désigner les groupes de diètes correspondants. D'autre part, en plus de contenir la même proportion de gras dans leur composition (34,9 %), les deux diètes riches en gras sont pauvres en cholestérol (<0,03 %) pour réduire son influence sur le développement de la maladie. De plus, il nous semblait particulièrement important de comparer les réponses à ces diètes chez les mâles et les femelles compte tenu de l'influence possible du sexe sur les adaptations métaboliques et cardiovasculaires de l'apport lipidique énergétique. Finalement, la deuxième partie de ce projet cherchait à évaluer l'impact de la stimulation différentielle des adipocytes sur l'évolution des altérations métaboliques et vasculaires dans un modèle de milieux conditionnés.

VIII. Choix du modèle cellulaire

La première partie de ce projet de recherche a été réalisée chez la souris afin d'étudier l'impact de l'apport lipidique sur le métabolisme général et sur les paramètres cardiovasculaires. Cependant, la compréhension de la physiopathologie des cellules clefs de cet événement morbide -le diabète associé à l'obésité- ainsi que son influence sur d'autres types cellulaires nous permet de mieux appréhender les processus responsables du déclenchement des altérations menant à la maladie et d'obtenir ainsi un traitement mieux ciblé.

De nombreuses études accusent le tissu adipeux, via ses sécrétions, d'être responsable des altérations métaboliques et cardiovasculaires liées à l'obésité (347; 367; 370; 479). Or, le tissu adipeux n'est pas composé exclusivement de cellules adipeuses mais comprend également des macrophages, des préadipocytes, des cellules souches, des fibroblastes, du tissu conjonctif et des vaisseaux sanguins. La plupart de ces composantes possèdent un rôle dans la pathogénèse métabolique et cardiovasculaire. Dans l'optique d'élucider le rôle spécifique des adipocytes matures dans les altérations vasculaires, nous avons isolé ces cellules du tissu gras abdominal viscéral des souris afin d'étudier leurs influences sur la physiologie et la viabilité des CML saines.

Diverses études ont été effectuées, en travaillant avec des préadipocytes extraits de patients normaux ou présentant diverses pathologies comme le diabète ou l'obésité ou même avec des lignées de préadipocytes comme les 3T3-L1 (480-483). Toutefois, notre étude possède l'originalité de travailler avec des adipocytes matures flottants, rarement référés dans d'autres travaux (483). De plus, ces adipocytes matures, responsables d'une grande partie de l'activité sécrétrice du tissu adipeux, ont été isolés de la masse adipeuse viscérale des souris des deux genres présentant divers degrés d'altérations métaboliques allant du normal au DT2. Donc, le choix de travailler avec des adipocytes matures nous a permis d'avoir des cellules dans divers états physiopathologiques avec un profil sécrétoire varié par conséquent. Ceci ne peut être possible avec une lignée cellulaire comme les 3T3-L1 ou des préadipocytes en cours de différenciation. De plus, les adipocytes matures ont montré leur capacité de vivre dans un milieu minimum dépourvu de sérum avec ou sans insuline ± glucose utilisés comme stimulants. La survie de ces cellules a pu être maintenue pendant plus de 72 heures sans atteinte à leur intégrité ou à leur fonction. Ainsi les cellules ont gardé leur forme sphérique intacte et une activité physiologique normale reflétée notamment par l'expression de PPAR γ 2, comparable à celles des cellules fraîchement isolées des souris.

L'étude de l'impact des modulations de la physiologie de ces cellules essentielles de l'homéostasie énergétique sur les CML était l'objectif de la deuxième partie du projet. Ainsi, des CML ont été isolées de l'aorte de souris C57BL/6J saines mâles et femelles. Pour étudier les effets des adipocytes matures sur l'induction d'altérations physiologiques et morphologiques de ces cellules vasculaires, les adipocytes isolés de la masse adipeuse abdomino-viscérale des souris ont été mis en culture, dans un milieu minimum (DMEM) dépourvu de sérum, en présence ou non de différents stimulants (insuline ± glucose). Ainsi, après 24 heures de culture, les adipocytes avaient conditionné les milieux de cultures par un cocktail de substances sécrétées. Par la suite, les CML saines ont été mises en culture dans ces milieux conditionnés par les cellules adipeuses. L'impact de la « soupe des facteurs adipeux » sur la morphologie, la fonction et la survie des CML fut ainsi étudié. Pour éliminer les facteurs de variations, les adipocytes ainsi que les CML provenaient de la même lignée de souris. De plus, les CML des souris mâles et femelles ont été mises en culture avec les surnageants des adipocytes provenant du même sexe pour éliminer les variations entre les genres. L'influence des différences entre les espèces et le genre des animaux a été écartée de la sorte pour mieux comprendre le processus qui se déroulait *in vivo*.

Il est aussi important de noter que cette technique de milieu conditionné *in vitro* présentait plusieurs avantages. Étant donné que les souris obèses possèdent une masse graisseuse significative, nous avons pu tester toutes les conditions de culture préétablies avec une population homogène et un nombre constant de cellules. Cela nous a permis de comparer les modulations stimulations-dépendantes entre elles. De plus, ce protocole était facile à utiliser chez la souris en raison de l'accessibilité aux organes cibles et de la commodité d'extraction des cellules d'intérêts.

IX. Modèle animal d'obésité et d'altérations métaboliques

La première partie de ce travail a permis de démontrer qu'une diète enrichie en matières grasses induit plusieurs phases d'altérations métaboliques, allant d'une intolérance au glucose jusqu'au DT2. Ce dernier présente toutes les caractéristiques de la pathologie humaine : une intolérance glucidique, une hyper-insulinémie jumelée à une atteinte à prédominance diastolique avec hypertrophie ventriculaire du cœur.

Les souris C57BL/6J mâles ont présenté un DT2 lié à l'obésité lorsqu'elles étaient alimentées avec un régime enrichi en matières grasses. Les souris de ce groupe, soumises à un régime riche en graisses animales présentent un stade plus avancé de la pathologie caractérisé par une hyper-insulinémie à jeun marqué par rapport aux deux autres groupes. Ceci suggère une résistance à l'insuline dans les organes périphériques de ces souris. Au contraire, très peu d'altérations de la glycémie ont été observées chez les femelles soumises aux mêmes régimes. Seules les femelles alimentées avec un régime enrichi en graisses animales présentaient une hyper-insulinémie. Nous avons ainsi pu développer un modèle comportant trois stades d'altérations métaboliques basés sur le type d'alimentation et le sexe des souris :

1. Un groupe présentant un état pré-diabétique caractérisé par un début d'intolérance au glucose et une hyper-insulinémie comme c'est le cas avec les souris femelles sous diète animale.
2. Un groupe exhibant un DT2 caractérisé par une intolérance au glucose et une hyper-glycémie à jeun comme c'est le cas chez les souris mâles sous diète végétale.
3. Un groupe exhibant un DT2 couplé à une hyper-insulinémie à jeun comme c'est le cas chez les souris mâles sous diète animale présentant un stade plus tardif de la pathologie.

Sur le plan métabolique, nous avons démontré que le régime enrichi en gras provoque une obésité avec hyper-leptinémie plus marquée dans le groupe DA. En outre, l'augmentation de la résistine circulante dans ce dernier corrélait avec l'hyper-insulinémie observée dans ce groupe. La diminution du taux d'adiponectine circulant chez les mâles était corrélée quant à elle avec l'augmentation de leur glycémie à jeun.

A. Rôle du genre dans l'établissement de ce modèle

Cette étude a permis de mettre en évidence l'influence du genre des animaux sur l'évolution de l'obésité et des altérations métaboliques associées en fonction des diètes administrées. Nous avons ainsi établi que les souris alimentées avec une diète enrichie en matières grasses animales présentaient une cinétique de prise de poids identique chez les mâles et chez les femelles. Par ailleurs, dans le groupe des souris alimentées avec une diète riche en gras végétal, les mâles adoptent une cinétique de prise de poids significativement plus importante que les femelles. Cette cinétique tend aussi à être plus importante que chez les mâles sous DA même si elle reste non significative à ce stade de l'étude. Finalement, l'extension du protocole de 4 semaines a permis aux femelles sous diète animale d'atteindre un gain pondéral significativement plus élevé que leurs homologues sous diète végétale. Toutefois, ces souris, même après 4 semaines supplémentaires de diètes par rapport aux mâles, étaient plus résistantes à développer des altérations métaboliques sévères en comparaison aux souris mâles. Ces observations ont été reportées chez l'humain (484) et des données épidémiologiques de l'agence de la santé publique du Canada indiquent qu'effectivement " (...) la prévalence du diabète est nettement plus élevée chez les hommes que chez les femmes (...)". Cela suggère un impact direct du sexe de la souris sur l'effet des diètes et des altérations qu'elles peuvent induire. Ainsi la diète végétale induit plus de charge pondérale chez les mâles ainsi qu'un DT2. Par ailleurs, la DA induit un DT2 lié à une hyper-insulinémie chez les mâles, alors qu'elle est associée seulement à une hyper-insulinémie chez les femelles, pour une prise de poids comparable.

La distribution du tissu adipeux accumulé chez les souris mâles et femelles est un des principaux facteurs de cette modulation de réponse aux diètes entre les deux sexes. En effet, lors de l'autopsie des souris au sacrifice, nous avons remarqué que les mâles soumis aux diètes enrichies en gras, accumulaient plus de tissus gras dans la partie viscérale de l'abdomen. Les souris femelles, quant à elles, avaient une accumulation de la masse grasse au niveau inférieur de l'abdomen, dans une morphologie dite « pantalon du zouave ». De ce fait, comme cela est bien établi dans la littérature (485; 486), l'accumulation viscérale du tissu adipeux, caractéristique de l'obésité androïde des mâles (239), est associée à une augmentation de l'intolérance au glucose et au développement du DT2 dans le groupe des souris mâles. L'action de la testostérone dans ce processus n'est pas négligeable. Cette hormone connue pour ses effets insulino-sensibilisants et hypocholestérolémiant chez les DT2 (487), est diminuée chez les mâles obèses en même temps que l'œstrogène est augmenté (488; 489). De ce fait, la testostérone antidiabétique perd de sa puissance au détriment de l'hormone féminine qui provoque une insulino-résistance chez les mâles (490).

De plus, l'œstrogène, responsable chez les femelles de l'orientation de l'obésité vers un phénotype gynoïde (239; 491-493), prévient le développement du DT2 et des altérations des cellules β pancréatiques liées à l'obésité (494). Ces effets sont perdus chez

les femmes ménopausées qui développent ainsi une obésité androïde (493; 495). De plus, il est bien établi que l'injection chronique du 17β -œstradiol à des souris femelles soumises à une ovariectomie, protège ces souris contre le développement d'une résistance à l'insuline induite par une diète enrichie en matières grasses (496). Ces données ont été reportées chez l'humain dans la *Heart Estrogen Progestin Replacement Study and the Women's Health Initiative* qui a démontré une association entre l'hormonothérapie et la réduction de l'incidence du DT2 chez les femmes ménopausées (497-499). Cela nous a permis d'émettre l'hypothèse du rôle possible des œstrogènes dans les diversifications des réponses aux diètes entre les genres via leur récepteur $ER\alpha$ établi comme facteur améliorant l'homéostasie glucidique (500) et possédant un rôle antidiabétique (501). Nous avons pu ainsi mettre en évidence, dans notre protocole, un taux d'expression deux à trois fois plus élevé des récepteurs oestrogéniques $ER\alpha$ dans les adipocytes des souris femelles comparativement aux souris mâles. Cependant, l'expression des récepteurs a été diminuée chez les souris mâles et femelles en réponse à l'ingestion des diètes enrichies en matières grasses par rapport à la diète normale comme cela fut confirmé chez l'humain (502).

Malgré cela, comment l'œstrogène et son récepteur joueraient-ils encore un rôle dans la résistance des souris femelles à développer le DT2 dans notre modèle? Diverses hypothèses peuvent expliquer cela. En effet, il a été démontré que l'obésité n'est pas associée à une modulation du taux circulant d'œstrogène (503; 504) même s'il est synthétisé et sécrété par le tissu adipeux (505; 506) comme rétrocontrôle inhibiteur de l'activité adipogénique (439; 452; 507). Cependant, l'apport lipidique des diètes fournit des facteurs stimulant la différenciation adipocytaire. De ce fait, nous pouvons stipuler que les adipocytes tendent à diminuer leur taux d'expression d' $ER\alpha$ par unité cellulaire pour maintenir leur potentiel mitotique et différentiel. Toutefois, même si l'hypothèse et la présence des inducteurs de rétrocontrôle négatif de ce récepteur, suite à la diète riche en gras, ne sont pas encore prouvées, le nombre total d' $ER\alpha$ dans le tissu adipeux abdominal peut ne pas être changé. En effet, l'évaluation du taux d'ARNm d' $ER\alpha$ des adipocytes est effectué avec une concentration donnée d'ARNm (12.5 ng/ μ l) extrait de 100 mg de tissu de chaque souris des groupes comparés. La diminution de son expression est donc par rapport à la concentration totale d'ARNm d'une masse donnée de cellules. Or le nombre total d' $ER\alpha$ dans la masse grasse de l'organisme est corrélé à l'accroissement du nombre d'adipocyte chez les souris obèses. De ce fait, nous pouvons nous attendre à une expression totale d' $ER\alpha$ comparable dans la masse grasseuse des groupes de souris femelles. Donc, le taux inchangé de l'œstrogène dans la circulation systémique garde son effet protecteur contre le DT2 au niveau du tissu adipeux des femelles, sans affecter l'adipogenèse ou le développement de l'obésité.

Malgré cela, comment se fait-il que cet effet protecteur de l'œstrogène ne soit pas observé chez les souris mâles, sous diètes enrichies en gras qui augmentent leur tissu gras sécréteur de cette hormone? En effet, il est bien établi que chez les mâles obèses, les androgènes sont transformés en œstrogènes dans le tissu adipeux (488; 489). Cependant, l'œstrogène exerce un effet pro-diabétique chez les mâles en induisant une résistance à l'insuline (490; 508). De plus, l'équipe de Houssay et coll. a démontré que l'administration d'œstrogène chez des rats ayant subi une pancréatectomie partielle, réduit de 75 % l'incidence du DT2 chez les femelles, alors qu'un effet moindre est observé chez les mâles (509). Ces résultats ont été reportés dans d'autres études (510-512).

Finalement, l'effet direct de l'œstrogène sur les sécrétions adipocytaires n'est pas bien connu. Cependant, il est bien établi que les récepteurs ER α influencent l'activité des récepteurs nucléaires caractéristiques du tissu adipeux PPAR γ (513; 514). En effet, ce dernier est responsable de la régulation du métabolisme en gouvernant le profil sécrétoire des adipokines (304). Dans notre modèle, les interactions entre ces deux facteurs de transcription sont reflétées par une diminution parallèle de leur expression dans le tissu adipeux abdominal des souris mâles et femelles, sous diètes enrichies en gras. Cependant, les femelles, qui maintiennent un niveau d'ER α plus élevé que le deuxième groupe, gardent un niveau de PPAR γ 2 deux fois plus important que les mâles. C'est donc via ce dernier que les œstrogènes pourraient influencer la sécrétion d'adipokines insulino-sensibilisantes chez les femelles pour retarder l'établissement du DT2. En effet, les différences entre les genres ont aussi été marquées par la modulation différentielle de la sécrétion d'adiponectine et de résistine en réponse à une même diète. L'adiponectine est une adipokine impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, et est connue pour ses effets insulino-sensibilisants et anti-inflammatoires (366; 368; 369; 479). Le taux circulant d'adiponectine fut diminué chez les mâles en réponse aux diètes riches en gras. Cependant, les femelles ont conservé une concentration circulante d'adiponectine stable par rapport au groupe contrôle malgré une diminution du niveau d'ARNm de cette adipokine dans leur tissu adipeux abdominal.

Un autre effet des hormones sexuelles est donc possible pour expliquer les différences entre les groupes de sexes observées dans notre modèle. Cependant, d'autres différences existent entre les souris du même sexe soumises aux diètes enrichies en matières grasses végétales versus animales. Quelle serait l'influence de ces deux diètes sur la progression des altérations métaboliques et est-elle en relation avec le sexe des animaux, prenant en considération que les différences sont plus marquées chez les femelles?

B. Rôle de la nature lipidique des diètes dans les altérations métaboliques

Les différences des altérations métaboliques observées entre les groupes de souris ne proviennent pas de la charge calorique des diètes enrichies en gras qui est identique. Elles apparaissent plutôt liées à la nature de la composition lipidique des deux régimes, en particulier à la structure chimique des AG qui y sont contenus. En effet, l'intégration des AG au sein des membranes biologiques conduira à des implications fonctionnelles différentes. C'est ainsi qu'une modification qualitative et quantitative du contenu phospholipidique perturbera la fluidité membranaire des cellules. En effet, cette fluidité dépend du degré d'insaturation des AG qui composent la membrane (plus les AG sont insaturés, plus fluide est la membrane), de la longueur de leurs chaînes de carbones (plus les chaînes sont longues, moins fluide est la membrane), et du taux de cholestérol imbriqué dans la bicouche phospholipidique réduisant la fluidité. C'est ainsi que le fonctionnement des récepteurs membranaires essentiels peut être perturbé ainsi que leur cascade de signalisation intracellulaire. La plupart des récepteurs membranaires, comme ceux de l'insuline ou de la leptine, forment des dimères après la liaison de leur ligand. Cependant, la rigidité de la membrane induite par les AG, empêche la dimérisation et la transmission du signal. Ainsi les cellules deviennent résistantes à l'insuline, à la leptine et à d'autres facteurs dont l'action passe par des récepteurs membranaires (515).

La différence de compositions en AG de nos diètes pourrait alors moduler la dynamique membranaire et contribuer ainsi aux altérations métaboliques au niveau cellulaire. En effet, la diète riche en matières grasses animales contient 37% de plus de gras saturé et 27% de plus d'AG polyinsaturés que la diète riche en matières grasses végétales. Par ailleurs, cette dernière comprend 27% de plus d'AG mono-insaturé que la diète riche en matières grasses animales. Ceci aurait un effet sur la composition de la bicouche lipidique. Ainsi, la diète animale peut potentiellement rigidifier la membrane par l'apport de gras saturé. Sa contenance de gras poly-insaturé pourrait limiter l'impact de ceux-là, certes, mais la plupart des AG poly-insaturés de cette diète sont à chaînes longues (C:20), ce qui n'améliore pas son impact.

Par ailleurs, indépendamment de son impact sur la bicouche membranaire, les AG des diètes influencent, par leur nature, l'établissement d'altérations métaboliques comme le diabète. En effet, la *European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk Study* a démontré une corrélation entre les AG saturés et le risque de diabète indépendamment du sexe, de l'âge et du poids des patients (516). De plus, il est bien établi que les AG saturés, à l'inverse des mono et polyinsaturés, contribuent à l'augmentation des LDL et des triglycérides circulants, ainsi qu'à l'établissement de la résistance à l'insuline (515; 517-519). Ainsi, la diète animale riche en AG saturés aurait un impact direct sur l'homéostasie

glucidique dans notre modèle. À l'inverse, la diète végétale contient une grande proportion d'AG mono-insaturés (67 %) essentiellement de l'acide oléique (C:18.1) décrit souvent pour ses vertus bénéfiques vis-à-vis de l'homéostasie lipidique et glucidique dans diverses études (520-523). L'acide oléique est surtout connu pour promouvoir la sensibilité à l'insuline et à améliorer son action au niveau cellulaire et systémique, et protégerait ainsi contre le DT2 (524-526). Les AG mono-insaturés de la diète végétale semblent donc avoir des effets limités sur le métabolisme glucidique (515; 523), à l'inverse des AG saturés de la diète animale qui induisent une résistance à l'insuline.

D'autre part, chaque type d'AG peut être oxydé de manière différente. Alors que l'oxydation des AG typiques se fait au niveau de la mitochondrie, celle des AG à chaînes longues (C20 ou plus) ne peut débuter que dans les peroxyosomes où ils seront réduits jusqu'à la formation de l'octonoyl-CoA qui sera ensuite oxydé dans les mitochondries. Lors d'un besoin énergétique rapide, l'utilisation des AG par les cellules génère des corps cétoniques dont l'accumulation mène à l'acidocétose qui peut être fatale. En effet, la β -oxydation trop rapide d'une trop grande quantité d'AG produit une grande quantité d'acétyl-CoA. Celui-ci est prioritairement utilisé par les mitochondries. Lorsque les mitochondries saturent, l'excédent d'acétyl-CoA subit la cétogenèse. De plus, les AG s'accumulent dans le cytoplasme cellulaire et induisent des dégâts irréversibles (527-529). En général, ce phénomène est observé chez les diabétiques de type 2 chez qui la production énergétique est basée sur le métabolisme des AG dû à un manque de glucose dans les cellules. Donc, plus la chaîne carbonée des AG est longue, plus l'oxydation est longue et plus le risque de lipotoxicité s'accroît.

Finalement, ne faut-il pas oublier les effets toxiques des AG saturés, notamment le palmitate, contenu dans la diète animale. En effet, les effets toxiques du palmitate sont plus spécifiques à cet AG qu'à la fonction de l'ACS et à la genèse de l'acétyl-CoA. En temps normal, les cellules adipeuses font face à l'excédent d'AGL par leur stockage sous forme de TAG dans leurs vésicules lipidiques avant leur utilisation. Cependant, le C_{16:0}-CoA possède une très faible affinité pour le DGAT dans la dernière étape de la synthèse de TAG (530). De ce fait, au lieu de la formation du TAG, le métabolisme du C_{16:0}-CoA mènera à la formation de céramide ou du DAG, deux produits finaux accusés d'être activateurs de la voie apoptotique des cellules (531; 532). Plusieurs études ont tentés de définir le rôle spécifique des céramides dans la mort cellulaire et certaines évidences suggèrent que l'action des céramides dans ce processus passe via les mitochondries. Cependant, du fait des diverses études contradictoires et variables, le rôle des céramides dans l'apoptose reste indéfini (533).

En dehors de ces aspects relatifs à la composition membranaire en lipides et à leur métabolisme, l'apport lipidique est un modulateur de l'activité adipocytaire et de la sécrétion d'adipokines. Au cours d'un apport alimentaire, la leptine est sécrétée par le

tissu adipeux comme hormone insulino-sensibilisante et médiante de l'oxydation des AG provenant de l'alimentation (188; 534). Ainsi l'hyperleptinémie postprandiale protège de nombreux organes contre la lipotoxicité due à l'augmentation des lipides circulants (535; 536). Par ailleurs, la leptine agit au niveau hypothalamique non seulement pour induire la satiété et diminuer l'apport alimentaire, mais aussi pour augmenter la thermogenèse, le métabolisme basal et l'activité cardiaque nécessaire à l'irrigation de tout l'organisme pour la distribution des nutriments (344). La leptine est aussi sécrétée comme modérateur de la sécrétion de l'insuline par le pancréas.

Cependant, l'obésité augmente le taux de triglycérides circulant dans le sang et mène à la résistance à la leptine et donc à l'annulation de tous ses effets métaboliques (537; 538). De plus, une hyperleptinémie chronique induit en soi une résistance à la leptine, mais aussi une résistance à l'insuline (539). De ce fait, le contrôle au niveau hypothalamique et périphérique est perdu, ainsi que la régulation des sécrétions des cellules β (540; 541). Ainsi, chez les obèses, le manque de satiété augmente la prise alimentaire et, en conséquence, la glycémie et la lipidémie. En réponse à l'hyperglycémie, l'insuline est produite en grandes quantités ce qui aggrave le DT2 chez ces sujets.

Dans notre modèle *in vivo*, il était fort remarquable qu'avec une augmentation similaire de la leptine dans les groupes mâles sous diètes enrichies en matières grasses, et les femelles sous diètes riches en gras animal, les altérations glycémiques étaient hétérogènes. En effet, en fin de protocole, les mâles sous diète riche en gras étaient diabétiques et les souris sous diètes animales étaient hyperinsuliniques. Deux facteurs entrent en jeu dans cette dissemblance : la nature des gras et, une fois de plus, le sexe des souris. En effet, alors que la diète animale semble induire une résistance à l'insuline reflétée par l'hyperinsulinémie dans les deux groupes correspondants, les œstrogènes agissent chez les femelles pour réguler l'homéostasie glucidique. Ces hormones sont connues pour leur action insulino-sensibilisante au niveau hépatique, musculaire et adipocytaire via leur récepteur ER α (500; 542). L'absence de l'activité des œstrogènes chez les souris mâles du même groupe se reflète par un DT2. Également, tel que discuté ci-dessus, les souris nourries avec la diète animale peuvent avoir dans leur circulation systémique un taux élevé de céramide connues pour induire une résistance à l'insuline (543; 544). Ceci expliquerait l'hyperinsulinémie observée chez ces souris. De plus, la résistine, adipokine connue pour induire une insulino-résistance (545), semble avoir des effets délétères accrus en présence de palmitate (546). Ces effets ont été corrélés à l'augmentation des céramides dans les cellules musculaires.

À l'inverse, la diète végétale ne semble pas induire une résistance à l'insuline ou à la leptine qui maintient son effet régulateur de la sécrétion d'insuline dans ce groupe. Cependant, avec un niveau d'insuline comparable au groupe contrôle, la diminution du taux d'adiponectine circulant chez les mâles de ce groupe pourrait expliquer l'installation

de l'hyperglycémie observée. Finalement, les femelles soumises à la diète végétale semblent être résistantes au développement des altérations observées dans les autres groupes. Ceci est corrélé à une leptinémie comparable aux souris contrôles avec un début de diminution de l'expression génique d'adiponectine dans leur tissu adipeux.

Par ailleurs, une diminution de la quantité de la cardiolipine peut conduire à diverses altérations métaboliques au niveau des cellules essentielles du métabolisme, notamment les cellules musculaires. La cardiolipine, ou diphosphatidylglycérol, est un phospholipide spécifique des membranes des mitochondries indispensables pour la structure fonctionnelle des protéines enzymatiques de la chaîne respiratoire pour effectuer la synthèse d'ATP. Ce rôle est bien illustré dans le syndrome de Barth soit une atteinte cardiaque due à une production défectueuse de cardiolipine, résultant en un fort déficit dans la production d'ATP. La cardiolipine est aussi un co-facteur déterminant de l'importation du cholestérol indispensable au déroulement de la stéroïdogénèse mitochondriale.

La cardiolipine est composée de 4 chaînes d'AG constitutifs polyinsaturés (20 : 5 ω 3). Sa biosynthèse se fait via la voie de la cytidine diphosphate-diacylglycérol et passe par divers processus de dé-acylation et re-acylation pour produire une forme mature composée de 3 à 4 moitiés d'acide linoléique (547). La tétralinoleoyl-cardiolipine est présente en grande quantité dans les muscles et le cœur (548), deux gros consommateurs de glucides. Il a été démontré que dans les phases précoces de diabète, lors de l'installation de l'intolérance glucidique, le taux de cardiolipine diminue considérablement dans ces organes (549). Dans notre étude, la variation de ce phospholipide au niveau de ces organes n'a pas été évaluée. Cependant, la composition de nos diètes indique que l'apport en acides linoléique et linoléique, deux AG essentiels pour la synthèse de la cardiolipine, était faible (<0.8 %) dans les diètes enrichies en matières grasses. Étant donné que la synthèse de ce phospholipide a pour facteur limitant ces AG, il est évident que l'apport en AG de l'organisme influence considérablement sa biosynthèse, et par conséquent la fonction mitochondriale (550). Cependant, il est bien établi que les AG insaturés, notamment l'acide oléique, stimule la phosphatidyl-glycérol-phosphate synthétase, enzyme clé de la synthèse de la cardiolipine (551; 552). Or, la diète enrichie en matières grasses végétales contient plus de 60% d'acide oléique dans sa composition. Cela pourrait avoir des effets bénéfiques sur ce facteur. La carence de substrat pour sa synthèse, empêche le processus de compensation de la perte de la cardiolipine, ce qui contribue au développement des altérations observées chez les souris. Cependant, la présence d'acide oléique dans la diète végétale prévient l'apparition des dommages observés avec la diète enrichie en gras animal. L'intolérance au glucose pousse les cellules musculaires, notamment cardiaques, à utiliser une autre source d'énergie. Le surcroît de l'utilisation d'AG par la cellule augmente la genèse de ROS qui ont la capacité, entre autre, d'oxyder les lipides polyinsaturés telle la cardiolipine. La

peroxydation de la cardiolipine et des AG en général est un des facteurs déclencheurs du processus apoptotique dans la cellule (553; 554). Par ailleurs, le palmitate peut enclencher la synthèse du sn-1,2-di16:0-phosphatidylglycérol, un précurseur de la cardiolipine. Cependant, la cardiolipine synthase possède une faible affinité pour ce précurseur. Ainsi, le taux de cardiolipine se trouve diminué et les cellules entrent en apoptose (555; 556).

En dehors de ces aspects relatifs à la composition membranaire en lipides, le rendement énergétique obtenu avec les AG est plus faible que celui réalisé avec le glucose, et plus dangereux pour la cellule en cas de surconsommation. En effet, comme cela a été introduit au début de cette thèse, l'oxydation des AG produit moins d'ATP pour la cellule. Certains auteurs ont évoqué le rôle physiopathologique d'un dérèglement du métabolisme énergétique des muscles dans le diabète (557). En effet, le métabolisme musculaire de base est assuré essentiellement par l'oxydation mitochondriale des AG. En cas de sollicitation hémodynamique (exercice, digestion, réaction de défense, etc.), le muscle se met à utiliser du glucose, plus facilement hydrolysable et offrant ainsi un rendement énergétique supérieur (558). Du fait de l'importance de l'insuline dans le transport glucidique, une déficience de sa synthèse ou une résistance à ses effets peuvent résulter en une réduction de l'utilisation du glucose, ce qui contraint le muscle à n'utiliser que les AG pour générer de l'énergie. L'augmentation de la consommation d'AG mène à une accumulation de produits lipidiques intermédiaires et de ROS générant des contraintes oxydatives et tous les effets cytotoxiques qui en découlent. Nous pouvons donc penser que les diètes enrichies en matières grasses favorisent, de par leur composition, l'apparition d'une résistance à l'insuline dans les groupes de souris correspondants.

C. L'insulino résistance et l'activité adipocytaire.

La question de l'origine de l'insulino-résistance n'est à ce jour toujours pas résolue. Plusieurs hypothèses ont été avancées. L'hyperlipidémie, en premier lieu, n'est pas loin d'être l'une des principales causes de la résistance à l'insuline. En effet, l'augmentation de l'activité adipogénique de PPAR γ 2 par les AG fournis par les diètes stimule la production de la leptine. Par conséquent, la leptine stimule la production de TNF α par le tissu adipeux (559) ; processus autocrine induit pour diminuer le stockage des lipides, puisque le TNF α inhibe l'adipogenèse (338; 560; 561). Par ailleurs, la leptine augmente le taux de l'IL-6 circulant dans un processus visant à diminuer l'adipogenèse dans le même sens que le TNF α (562). Or, il se trouve que ces deux cytokines sont impliquées dans les processus d'insulino-résistance, en agissant au niveau des récepteurs

de l'insuline (339; 563). Il pourrait donc exister un lien direct entre le degré de surcharge lipidique induit par l'alimentation et le développement du DT2 et des altérations cardiaques qui lui sont associées. D'autre part, le TNF α , aussi bien que l'IL-6, est souvent évoqué comme cytokine inhibant la production et l'action de l'adiponectine au niveau périphérique. En effet, chez nos souris mâles, des deux groupes de diètes riches en gras, voient leur taux d'ARNm de TNF α augmentés dans leurs tissus adipeux. Même si son taux circulant n'est pas varié, le TNF α modulé localement est corrélé à la diminution de la sécrétion de l'adiponectine et de son taux d'ARNm. La diminution de cette hormone hypoglycémiante avait des conséquences sur l'établissement du DT2 chez ces souris et de la résistance à l'insuline dans le groupe DA des souris mâles. L'effet domino s'amplifie du moment où l'adiponectine, connue pour son rôle inhibiteur de la production du TNF α et de l'IL-6, est diminuée. Chez les souris femelles sous diètes riches en gras, l'effet anti-TNF α de l'adiponectine, dont le taux circulant est resté néanmoins normal par rapport au groupe contrôle, peut avoir prévenu l'hyperglycémie chez ces souris. Cependant, la diminution du taux d'ARNm codant pour l'adiponectine dans le tissu adipeux de ces souris laisse présager une diminution de son taux circulant avec un protocole prolongé. Ainsi, nous pouvons dire que les souris femelles sont seulement décalées dans le temps vis-à-vis des souris mâles quant au développement du DT2 mais aussi non totalement protégées.

D'autres facteurs sont reliés à l'obésité et peuvent mener à la résistance à l'insuline. En effet, la résistine et le RBP-4 sont deux adipokines bien connues pour leur capacité à induire une résistance à l'insuline. La résistine stimule la production du TNF α et de l'IL-6 (479), deux cytokines altérant la sensibilité à l'insuline, comme discuté précédemment. La résistine ainsi augmentée dans le groupe DA a contribué à l'installation de l'hyperinsulinémie dans ce groupe. Par ailleurs, même si son effet n'est pas très clair chez l'humain, il est bien établi que le RBP-4 altère la signalisation insulinique dans les muscles murins (399). L'implication du RBP-4, sécrété par le tissu adipeux viscéral, est fort plausible dans notre modèle (564). De ce fait, les souris mâles, présentant une accumulation viscérale de tissu adipeux plus élevée que les femelles, souffrent davantage d'hyperglycémie que celles-ci.

X. La cardiomyopathie diabétique des souris.

Nous avons discuté ci-dessus qu'une altération de la production de cardiolipine pourrait être l'une des conséquences des diètes fournies aux souris. Cette altération mène à une dysfonction mitochondriale importante dans le tissu musculaire et notamment cardiaque. L'altération de la fonction mitochondriale est bien connue pour son effet hypertrophiant au niveau cardiaque (565). Par ailleurs, l'hyperglycémie possède également des effets délétères sur les mitochondries. En effet, l'augmentation de la glycémie systémique cause la production de ROS par les mitochondries (566), ce qui entraîne une dysfonction contractile des cardiomyocytes (567). L'augmentation de ROS inhibe la production de NO entraînant une inflammation cardiaque et une dysfonction endothéliale (568).

Indépendamment de l'impact de l'hyperglycémie, l'augmentation du taux des AG circulants de nos souris serait un autre facteur responsable des perturbations métaboliques cardiaques menant à la cardiomyopathie. En effet, un excès de TAG dans les cardiomyocytes est associé à une hypertrophie cardiaque, à l'apoptose et au développement de cardiomyopathie (569). L'augmentation de la β -oxydation et l'accumulation d'AG dans les mitochondries peuvent induire leur dysfonction (570). De plus, l'utilisation d'AG par les cellules diminue l'emploi de glucose dans le métabolisme et entraîne la production de ROS et donc de dysfonction contractile (571).

Un autre facteur pourrait contribuer à l'apparition de la cardiomyopathie diabétique chez les souris. Nous avons, en effet, observé une nette augmentation de la leptine plasmatique chez ces animaux. Cette adipocytokine a été décrite comme un activateur de l'activité du système nerveux sympathique, suite à son action au niveau du système nerveux central (344). Cette activation est responsable de l'induction d'une tachycardie, ce qui augmente le travail et donc parallèlement le métabolisme cardiaque et la production de ROS. De plus, elle peut stimuler l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) contribuant à aggraver l'hypertrophie et le remodelage cardiaque (572). Le SRAA contribue à la formation de fibrose interstitielle (557). Cela peut induire une réduction de la compliance myocardique et une augmentation des pressions de remplissage ventriculaire.

Des altérations morphologiques et fonctionnelles ont été détectées en échocardiographie, associées à l'hypertrophie ventriculaire chez les souris nourries avec les diètes riches en gras. Cependant, des études tissulaires et cellulaires plus approfondies seraient nécessaires pour mieux élucider les mécanismes impliqués dans le développement de la cardiomyopathie diabétique de ces souris.

XI. Modèle cellulaire de milieu conditionné

L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins ainsi que de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média. Le DT2 lié à l'obésité est un facteur contribuant au développement du processus inflammatoire caractéristique de l'athérosclérose. Ces altérations métaboliques liées à l'augmentation de la masse adipeuse, induisent des dysfonctions artérielles menant à l'athérosclérose. Alors qu'une lésion de l'endothélium est mise en cause, certaines études pointent la dysfonction des CML comme déclencheur de l'athérosclérose. Des études récentes ont confirmé la présence de CML dans les plaques athérosclérotiques. Ces cellules provenant de la média présentaient un phénotype différent des CML natives (573; 574). Même si leur rôle dans l'athérogénèse n'est pas clair, la différenciation de ces cellules en cellules spumeuses est cependant bien démontré (127). De plus, ce changement phénotypique est jumelé à un changement fonctionnel de ces cellules qui expriment des marqueurs des macrophages (575).

Les facteurs impliqués dans les altérations fonctionnelles et phénotypiques des CML sont encore mal connus. Étant donné que ces altérations sont souvent reliées à l'obésité et au DT2, l'implication du tissu adipeux dans ce processus ne peut être exclue. En effet, le tissu gras n'est pas un simple tissu passif de stockage énergétique, mais aussi une glande active sécrétant diverses adipokines. Ces facteurs regroupent des molécules inflammatoires parmi lesquels le $TNF\alpha$ et de nombreuses interleukines (IL-6, IL1 β , IL-8 et IL-10) (576). L'obésité est la conséquence d'importants changements dans le nombre (hyperplasie), la taille (hypertrophie) et la fonction des adipocytes ainsi que l'activité de leurs récepteurs nucléaires notamment PPAR γ . La nature des AG fournis par les diètes régulent l'activité de PPAR γ et influencent ainsi l'adipogenèse et la morphologie des cellules (577). Ainsi, dépendamment de leur nature, les AG circulants induisent leur stockage dans les vésicules lipidiques des adipocytes ou leur mitose. En conséquence, le tissu adipeux s'hyperplasia ou s'hypertrophie. Dans ce dernier cas, le métabolisme des adipocytes est plus affecté et tend à développer une résistance à l'insuline (578). Ce processus permet ainsi aux cellules adipeuses d'arrêter le stockage infini d'AG. La sécrétion d'adipokines est ainsi modulée en fonction de la nature des AG circulants dans l'organisme comme cela fut établi dans notre modèle *in vivo*.

Dans l'optique de mieux comprendre le rôle du tissu adipeux dans l'athérogénèse, nous avons voulu, dans la deuxième partie de ce projet, évaluer l'impact des adipocytes sur les CML. Pour cela, nous avons extrait les cellules adipeuses des différents groupes de souris, présentant divers stades d'altérations métaboliques allant jusqu'au DT2. Ces

cellules ont servi à conditionner des milieux de cultures cellulaires afin d'étudier l'impact des sécrétions adipocytaires sur les CML. Ce protocole a montré pour la première fois l'impact des adipocytes matures indépendamment des autres composantes du tissu adipeux sur les CML. Ces cellules flottantes à morphologie sphérique gorgées de lipides ont maintenu leurs caractéristiques morphologiques ou physiologiques en culture pendant plus de 72 h. Nous avons ainsi pu démontrer des effets de stimulations dépendantes des surnageants des adipocytes sur la prolifération, la migration et la viabilité de ces cellules.

A. Influence des diètes

L'augmentation de la masse adipeuse dans l'obésité est associée à une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes du tissu adipeux (234; 579). Cette balance entre hypertrophie/hyperplasie cellulaire est déterminée en fonction de la localisation du tissu adipeux, de la disponibilité des précurseurs des adipocytes et de la nature des AG stockés (235). Ainsi, un taux faible d'adipogenèse dans le tissu adipeux mène à une hypertrophie adipocytaire (236). L'analyse par microscopie des adipocytes extraits des différents groupes de souris a révélé que la nature du gras des diètes modulait de façon importante la morphologie et la physiologie de ces cellules. Comme cela est démontré dans la Figure 6-1, la taille ainsi que la densité des cellules adipeuses dans un extrait de tissu adipeux digéré, varie selon la diète et le sexe de la souris d'où est extrait le tissu. Ainsi, nous avons discerné des différences entre les souris contrôles et les souris obèses, qui présentaient une hyperplasie (comptage après digestion du tissu gras) et une hypertrophie des adipocytes au sein de leurs tissus gras. Ces modulations morphologiques sont non seulement reliées à la nature des diètes, mais aussi au sexe des souris. En effet, la diète enrichie en gras animal induit plus d'hypertrophie que la diète enrichie en gras végétal en plus de l'hyperplasie tel que nous l'avons remarqué lors de l'extraction des adipocytes. Par ailleurs, les cellules adipeuses sont relativement moins hypertrophiées chez les femelles.

L'apport lipidique, ainsi que les altérations métaboliques, influencent en grande partie ces paramètres. En effet, PPAR γ 2, qui a été présenté dans l'introduction de ce rapport comme le récepteur nucléaire responsable de la différenciation adipocytaire, est modulé par le type des AG circulants et de leurs métabolites (578). Nous avons démontré que le taux d'ARNm de ce récepteur nucléaires est diminué dans le tissu adipeux des souris soumises à des diètes enrichies en gras. Un taux faible d'adipogenèse dans ce tissu mène à l'hypertrophie adipocytaire tel qu'observé dans notre expérience (236). Les femelles dans chaque groupe de diète semblent avoir des adipocytes moins hypertrophiés que chez les mâles. Ceci est corrélé aux taux d'expression d'ARNm des récepteurs oestrogéniques plus élevés chez les femelles qui préviennent ce phénomène (437).

L'hypertrophie des adipocytes indique leur saturation en AG et la modulation de leur métabolisme à ce stade de l'étude (578). Ainsi, ces cellules deviennent insulino-résistantes, processus naturel qui se produit pour limiter le développement du tissu adipeux et de l'obésité. Ce processus, physiologique au départ, se transforme en un état pathologique avec l'inhibition de la lipogenèse et l'activation de la lipolyse. Subséquemment, le taux d'AG libéré dans la circulation augmente ce qui altère la physiologie et le fonctionnement d'autres cellules de l'organisme, notamment les cellules musculaires qui n'ont plus de sources énergétiques autres que les AG. La composition et la nature en gras des diètes influencent ainsi le profil sécrétoire des adipokines. En conséquence, les cellules dont le métabolisme est régulé par ces médiateurs de l'homéostasie glucidique et lipidique sont affectées.

En confirmation des évaluations *in vivo*, nous avons déterminé un profil de sécrétion de leptine et d'adiponectine équivalant dans les surnageants des adipocytes en cultures. Ainsi, les adipocytes provenant de souris soumises à des diètes enrichies en matières grasses voient leur production de leptine augmentée, et celle de l'adiponectine diminuée. Ces modulations vont en parallèle avec les modulations morphologiques et géniques (ARNm d'adiponectine, de TNF α , etc.) du tissu adipeux ; les deux étant influencés par la nature des gras des diètes mais dépendent également de la stimulation des adipocytes. Le degré de modulation de la balance adiponectine/leptine dans les surnageants des adipocytes en culture influence à un grand niveau le phénotype, la morphologie et la viabilité des CML vasculaires.

B. Conditions de cultures des adipocytes et leurs effets sur les cellules musculaires lisses

Il est bien établi que la fonctionnalité des adipocytes est perdue lorsque l'obésité survient. Ceci est associé à l'hypertrophie cellulaire, au déséquilibre entre la lipogenèse et la lipolyse, à la dérégulation des facteurs clés de l'adipogenèse et à une résistance aux signaux externes régulant l'homéostasie cellulaire telle l'insuline (545). Nous avons montré ci-dessus que les adipocytes des souris sous diètes enrichies en gras étaient hypertrophiés. Dans le but d'étudier l'impact de ces modulations physiologiques et des altérations associées des cellules adipeuses sur les CML, l'expérience de milieux conditionnés a été mise en place dans la deuxième partie de ce projet de doctorat. Les adipocytes ont été isolés par une série de digestion et de lavage du tissu adipeux des différents groupes de souris. Après 24 heures de culture en présence ou non de stimulation insulinique et/ou glucidique, les milieux de cultures des adipocytes ont été récoltés pour stimuler des CML d'aortes isolées de souris saines. Cela nous a permis

d'étudier, en conditions physiologiques et pathologiques, l'impact des sécrétions adipocytaires sur la physiologie et la viabilité des CML dans le but d'élucider certains processus physiopathologiques pouvant mener à l'athérogénèse.

1. Adipocytes non stimulés

Pour évaluer les effets des modifications diète-dépendantes du tissu adipeux sur les CML, des cellules adipeuses ont été extraites des différents groupes de souris pour conditionner les milieux de culture des CML saines. Les surnageants d'adipocytes des souris soumises aux diètes enrichies en gras contenaient 3 fois plus de leptine que les surnageants des cellules contrôles. Par ailleurs, la sécrétion d'adiponectine était diminuée de plus de 50 % dans les groupes correspondants. Ce déséquilibre dans le rapport de ces deux adipokines dans les milieux de culture des adipocytes provenant des souris des groupes de diètes riches en gras a eu un impact bien marqué sur les CML. Ainsi les CML perdent leur morphologie fusiforme caractéristique des CML saines au détriment d'une forme pentagonale diffuse. Par ailleurs, les cellules traitées avec les surnageants des adipocytes du groupe AD présentaient des vésicules lipidiques caractéristiques des cellules spumeuses. Ces vésicules sont mises en évidence par la coloration Oil Red O spécifique des lipides. À ces altérations morphologiques est associée une désorganisation des filaments alpha d'actine des CML observée en microscopie confocale (Figure 6-2).

À ces modifications morphologiques sont également associées des altérations fonctionnelles et physiologiques. Ainsi, les CML traitées par les surnageants des adipocytes mâles du groupe DA proliféraient moins que les deux autres groupes. Au contraire, les CML femelles traitées par les surnageants du même groupe augmentaient leur potentiel prolifératif. L'augmentation de la prolifération des CML traitées par ces surnageants était attendue surtout que la leptine, connue pour son effet pro-prolifératif (361), était augmentée et que l'adiponectine anti-proliférative (580) était diminuée dans les surnageants correspondants. Toutefois, l'augmentation de la prolifération est absente dans le groupe des mâles; elle est même réduite dans les CML traitées avec les surnageants des adipocytes du groupe DA. En effet, le taux d'adiponectine par rapport au groupe contrôle est beaucoup plus sévèrement réduit dans le groupe des mâles que dans le groupe des femelles. De ce fait, l'oxydation des AG dans ces cellules est beaucoup plus importante et la production de ROS l'est en conséquence (581).

Les lipides connus pour prévenir la prolifération des CML sont absents dans les diètes grasses, notamment l'acide linoléique (582). De plus, l'acide oléique qui promeut la prolifération des CML est présent dans les diètes grasses (583). Donc, comment les adipocytes du groupe DA des souris mâles réduisent-ils la prolifération par rapport aux

deux autres groupes? Ceci est dû au fait que les adipocytes du groupe DA ont induit l'apoptose des CML caractérisée par l'augmentation de l'expression de FAS et une élévation significative de l'activité de la caspase-3. Cette apoptose est la conséquence de l'augmentation de l'expression de TNF α par les adipocytes de ce groupe (584). De plus, le DT2 développé par les souris augmente le nombre de protéines glyquées (AGE, *Advanced Glycation End-products*) dans les parties intracellulaires et membranaires (585). Les AGE diminuent d'une part la sensibilité à l'insuline des adipocytes et augmentent d'autre part la production de ROS dans les cellules correspondantes (586). De ce fait, la lipolyse est augmentée dans les adipocytes ce qui augmenterait la libération des AG saturés des vésicules lipidiques dans le surnageant connu pour être pro-apoptotiques (131; 587). De plus, la glycation des protéines, qui peut toucher aussi les protéines sécrétées par les adipocytes tel que les adipokines, entraîne l'augmentation des AGE dans les surnageants des adipocytes. Ceux là agiraient au niveau des CML pour induire la production de ROS et de l'apoptose en conséquence. Finalement, comme discuté précédemment, la DA est riche en palmitate propice à la production de céramide. Ainsi, ces cellules adipeuses, considérées insulino-résistante, peuvent saturer le milieu de culture en céramide et potentialiser ainsi le processus apoptotique dans les CML (531).

L'apoptose est aussi induite dans le groupe des CML femelles mais elle n'affecte pas au même degré la prolifération cellulaire. Ceci est probablement dû au fait que les surnageants des adipocytes provenant des souris femelles contiennent une concentration d'adiponectine plus élevée que dans les surnageants des adipocytes extraits des souris mâles. Le rôle de cette adipokine dans ce processus n'est pas clairement établi, mais on pourrait croire qu'elle stimulerait la prolifération via son action insulino-sensibilisante (588). De ce fait, le taux de cellules en apoptose dans le groupe des femelles serait compensé par le taux de prolifération induit par l'adiponectine qui est augmentée chez les femelles. Toutefois l'apoptose pourrait être la cause de l'absence de corrélation entre le taux de prolifération et le niveau de la leptine dans les surnageants des adipocytes de ce groupe. Finalement, les gras d'origine végétale ne semblent pas induire une modulation de la prolifération ou une induction de l'apoptose comparé au groupe contrôle. Ceci est corrélé à la morphologie adipocytaire qui demeurerait moins hypertrophiée que leurs homologues de la DA. En effet, nous pouvons nous attendre à une sensibilité normale de ces cellules aux facteurs externes pour réguler leur fonction en dépit de la modulation de leur sécrétion d'adipokines. De plus, les AG mono-insaturés contenus dans ces cellules et qui sont sécrétés dans leurs surnageants sont moins délétères que les AG saturés du groupe DA (131).

Par ailleurs, le débalancement semblable mais non équivalent des adipokines dans les surnageants des adipocytes des souris mâles et femelles sous diètes riches en gras induit une modulation différentielle de la migration des CML. Alors que les adipocytes mâles augmentent la migration des CML, les cellules femelles présentent une modulation

inverse. Dans ces groupes, nous avons évalué un taux élevé de leptine dans les surnageants adipocytaires : adipokine stimulatrice de la migration des CML (361). Cela expliquerait l'augmentation de la migration dans le groupe des mâles dont les adipocytes ont sécrété jusqu'à 4 fois plus de leptine que les groupes contrôles. Par ailleurs, la diminution de la migration des CML induite par le surnageant des adipocytes du groupe des femelles est due à la forte concentration des surnageants adipocytaires en adiponectine par rapport aux groupes mâles. En effet, cette adipokine est connue pour prévenir la migration cellulaire (589). De plus, malgré son augmentation par rapport au groupe contrôle, la leptine reste cependant 4 fois moins élevée dans les surnageants des adipocytes des souris femelles en comparaison avec les cellules des souris mâles correspondantes.

Sur le plan physiologique, les surnageants des adipocytes provenant des souris alimentées avec des diètes riches en gras ont induit une augmentation de l'expression génique de CD36 dans les CML sans affecter celui du récepteur à l'insuline. L'augmentation de l'expression de ce récepteur éboueur reflète la capacité de ces cellules à capturer des AG et mener leur phénotype vers des cellules spumeuses (590). Cela est bien démontré par le marquage Oil Red O qui illustre une accumulation des AG dans le cytoplasme des cellules notamment celles traitées par les surnageants d'adipocytes du groupe DA (Figure 6-2). Cette accumulation des AG est fort probablement responsable des altérations morphologiques des CML reflétées par la désorganisation des filaments d'actine, mais également de l'apoptose induite dans les cellules traitées avec les surnageants des adipocytes du groupe AD.

Cependant, l'expression de l'ARNm de CD36 dans les CML peut ne pas être corrélée à son expression protéique dans ces cellules. En effet, les protéines de ce récepteur sont localisées dans des vésicules intracellulaires et leur recrutement à la membrane nécessite des stimuli externes dont l'insuline. La résistance à l'insuline des CML traitées avec les surnageants des adipocytes peut être une cause de l'augmentation de l'expression de l'ARNm de CD36. La présence de surplus d'AG dans les surnageants stimulerait dans ce cas l'expression de CD36 mais le manque de réponse à l'insuline empêche néanmoins son recrutement à la membrane. Ceci est probablement dû à un contrôle cellulaire de l'intégration des lipides dans leur cytoplasme surtout qu'il a été démontré que l'absence de recrutement des CD36 à la membrane retarderait le développement d'une résistance à l'insuline (591). Toutefois, des expériences récentes ont montrées une augmentation d'expression protéiques et géniques de CD36 dans les cellules musculaires de sujets obèses résistant à l'insuline et ce cas de figure ne peut être exclu de nos expériences (590).

D'autres facteurs présents dans les surnageants adipocytaires, comme les AGE par exemple, peuvent augmenter l'expression de CD36. En effet, il est établi que les cellules

musculaires saines expriment ces récepteurs en réponse à une surcharge lipidique pour améliorer leur oxydation et la production d'énergie (592). L'expression de ces récepteurs membranaires est essentiellement induite par les AG mono-insaturés, notamment l'acide oléique présents dans les deux diètes enrichies en gras (593). Cependant, les adipocytes des souris mâles du groupe DA induisent plus d'expression de CD36 que ceux du groupe DS et DV. Les adipocytes de ce groupe provenant de souris diabétique tel que discuté ci-haut, augmenteraient l'expression des récepteurs éboueurs CD36 bien connus pour être des récepteurs des AGE (594; 595).

D'un autre côté, le taux d'expression de CD36 était plus élevé chez les femelles par rapport aux mâles dans tous les groupes de traitement. Rappelons que les CML provenaient des souris de même sexe que celui des adipocytes conditionnant leur milieu de culture. Donc les CML traitées par les adipocytes des souris femelles proviennent de souris femelles. Or ces dernières sont connues pour avoir des récepteurs moins sensibles à l'insuline que les mâles (596). De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse que pour contrecarrer la moindre sensibilité à l'insuline, les CML femelles exprimeraient plus de CD36, connu pour renverser la résistance à l'insuline (597). Cette hypothèse va en parallèle avec le manque d'accumulation de gras dans les cellules correspondantes et ce malgré le taux d'ARNm de CD36 comparable à ceux des CML traitées par le surnageants des adipocytes du groupe DA.

Finalement, les adipocytes provenant des souris femelles du groupe DV ont induit via leur sécrétion une réduction de l'expression génique du récepteur à l'insuline. En effet, les AG contenus dans les adipocytes sont essentiellement des AG mono-insaturés notamment de l'acide oléique. Ce dernier, comme discuté précédemment, est un insulino-sensibilisant aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau systémique (524-526). De ce fait, la présence de ces AG dans les surnageants adipocytaires augmenterait la sensibilité des CML à l'insuline. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet de l'acide oléique jumelé à celui de l'adiponectine induit un rétrocontrôle négatif contre le récepteur à l'insuline du fait de l'hypersensibilité à l'insuline qui s'installe. Cet effet n'a pas été observé avec les adipocytes mâles qui sécrètent 4 fois moins d'adiponectine que le groupe femelle. Finalement, la résistine, une adipokine pro-proliférative, pourrait jouer un rôle dans la prolifération des CML de notre modèle expérimental (598). En effet, le taux circulant de cette adipokine est augmenté dans les souris soumises à la diète riche en gras animal. Quoique non vérifié, cela pourrait avoir une influence sur son taux dans les surnageants des adipocyte de ce groupe mis en culture.

2. Stimulation en condition d'hyper insulinémie

L'hyper-insulinémie est l'une des caractéristiques du DT2. Dans l'objectif de mieux comprendre la réponse des adipocytes à une stimulation d'insuline, nous avons stimulé ces cellules avec un taux d'insuline comparable à celui des souris diabétiques. Les cellules de souris contrôles que nous considérons normales ou celles des souris hyperglycémiques et/ou hyperinsuliniques ont été comparées entre elles. D'une façon globale, cette stimulation augmente légèrement la production d'adiponectine par les adipocytes des groupes femelles et du groupe mâle sous DS sans l'affecter chez les mâles des groupes DV et DA. Par ailleurs, l'insuline augmente également la leptine dans les surnageants adipocytaires de tous les groupes. Ces modulations de sécrétions de ces adipokines ne modifient pas l'impact des surnageants des adipocytes sur la morphologie des CML par rapport aux surnageants des adipocytes non stimulés. Cependant, elles exercent un impact direct sur les autres paramètres physiologiques.

L'augmentation du taux d'adiponectine dans les surnageants des adipocytes des souris mâles du groupe DS a induit une diminution de la prolifération des CML par rapport aux surnageants des adipocytes non stimulés. Par ailleurs, l'augmentation de 2 à 4 fois de la leptine dans les surnageants des adipocytes des groupes femelles, suite à la stimulation insulinique, a induit une augmentation de la prolifération des CML. Ces observations vont en parallèle avec l'effet antiprolifératif de l'adiponectine et avec l'effet pro-prolifératif de la leptine. Par ailleurs, il est bien établi que l'insuline induit la sécrétion du VEGF et du FGF par les adipocytes, deux facteurs connus pour promouvoir la prolifération des CML (599-601). De plus, nous avons démontré chez nos souris femelles que le taux d'expression d'ER α dans leurs adipocytes était 4 fois plus élevé par rapport aux adipocytes des mâles. Ces récepteurs sont connus pour leurs effets insulino-sensibilisants (602). De ce fait, nous pouvons en déduire que les adipocytes femelles sont plus sensibles à la stimulation d'insuline et sécrètent plus, de ce fait, de facteurs de croissance pro-proliférative. En conséquence, les adipocytes des souris femelles des groupes DV et DA induisent plus de prolifération des CML par rapport au groupe contrôle. Ceci va en parallèle avec l'hypo-adiponectinémie des surnageants des adipocytes correspondants. Les surnageants du groupe contrôle avec leurs taux d'adiponectine stable et deux fois plus élevé restent anti-prolifératifs.

Les surnageants des adipocytes des souris mâles, quant à eux, ne modifient pas la prolifération des CML par rapport aux adipocytes non stimulés. Dans le groupe DV, les cellules répondent à la stimulation d'insuline en relation avec l'état général des souris correspondantes. De ce fait, l'insuline induit la lipogenèse dans ces cellules qui sécrètent moins d'AG dans leurs surnageants. Par ailleurs, la diminution du taux d'expression d'ER α dans les adipocytes, ainsi que la faible concentration d'adiponectine limiteraient cette sensibilité à l'insuline et ses effets sur la sécrétion d'agents pro-prolifératifs. Par ailleurs, les cellules du groupe DA des mâles diabétiques sont moins sensibles à l'insuline et sollicitent ainsi moins cette hormone. Ceci expliquerait l'augmentation du taux

d'expression des récepteurs à l'insuline dans les CML correspondantes qui se trouvent avec plus d'insuline dans les surnageants. De plus, les cytoplasmes gorgés de lipides inhibent la signalisation intracellulaire de l'insuline (603). Ainsi, le taux d'AG dans leurs surnageants serait plus élevé dû à un manque de signalisation d'insuline qui stimule la lipolyse ce qui induirait plus d'apoptose au niveau des CML. Ceci est mis en lumière dans ce groupe stimulé à l'insuline, qui augmente les facteurs apoptotiques dans les CML. Cette induction de la mort cellulaire expliquerait le manque de prolifération en plus du manque de réponse à l'insuline et de production d'agents pro-prolifératifs.

En outre, il est bien établi que la concentration d'adiponectine est inversement corrélée à celle de la résistine (604). Cette adipokine qui possède des effets pro-proliférative sur les CML (598), pourrait être induite dans les adipocytes femelles du groupe DA qui présentent une réduction de leur ARNm d'adiponectine par rapport aux autres groupes et une diminution de son taux d'expression dans leur surnageants correspondants. De plus, ce groupe présentait une augmentation de la sécrétion de résistine dans sa circulation systémique *in vivo*.

Par ailleurs, la migration des CML est augmentée suite à la stimulation par les surnageants d'adipocytes des groupes de souris mâles sous diète enrichie en gras. Elle est diminuée en réponse à la stimulation des surnageants adipocytaires du groupe DV et modérément augmentée dans le groupe DA. Ceci va en concordance avec l'hypothèse discutée ci-dessus quant au rôle de l'insuline dans la sécrétion de facteurs pro-prolifératifs par les adipocytes. En effet, les surnageants des adipocytes du groupe des femelles, que nous supposons concentrés en facteur de croissance, équilibrent le gradient de chémo-attractant entre les deux compartiments de la plaque de migration. Ceci limiterait la migration cellulaire en fonction de la concentration des facteurs des deux côtés. Au contraire, chez les mâles, nous avons démontré que les adipocytes sécrèteraient moins voire pas du tout de ses facteurs et les cellules migrent plus facilement.

Finalement, les CML traitées par les surnageants des adipocytes des groupes DV et DA mâles stimulés à l'insuline migrent plus qu'avec les surnageants des cellules non traités. Ceci peut être dû à une activation de PPAR γ du fait de la sécrétion d'AG en réponse à la résistance à l'effet lipogénique de l'insuline, surtout dans le groupe DA. En effet, PPAR γ est connu pour son effet pro-prolifératif et pro-migratoire (605; 606). Cette activation de PPAR γ se reflète par un niveau plus important d'expression de CD36 dans les CML étant donné que ce récepteur nucléaire augmente l'expression de CD36 *in vitro* pour induire un phénotype macrophagique (575). Finalement, l'expression de CD36 dans les CML des groupes contrôles et des groupes femelles est dû à la stimulation insulénique connue pour son rôle dans l'augmentation de l'expression de ce récepteur (607). De plus, la résistine, dont la concentration est inversement proportionnelle à celle de l'adiponectine, pourrait être augmentée dans les surnageants des adipocytes qui diminuent

leurs sécrétions d'adiponectine. Nous parlons plus spécifiquement des surnageants du groupe DA des mâles et des femelles où l'adiponectine est la plus affectée et où le taux de résistine est augmenté *in vivo*. De ce fait, sa présence dans ces surnageants induirait l'expression de CD36 pour contrecarrer l'effet de l'adiponectine qui l'inhiberait (608-610).

3. Stimulation en condition d'hyperglycémie ou de diabète de type 2

Les signes précoces de l'installation du DT2 sont le développement de l'intolérance au glucose et l'augmentation de la glycémie systémique. À des phases plus avancées de la maladie, l'hyper-insulinémie se développe du fait de la résistance à l'insuline et le DT2 s'installe ainsi. Pour reproduire l'environnement des adipocytes des souris intolérantes au glucose ou diabétiques, et pour étudier l'impact de cet environnement sur les cellules des autres groupes, nous avons mis en culture les adipocytes des souris des différents groupes dans un milieu reproduisant les conditions d'une intolérance au glucose (hyperglycémie) ou de DT2 (hyperglycémie + hyper-insulinémie).

La stimulation glucidique augmente la sécrétion d'adiponectine et de leptine dans les surnageants de tous les groupes d'adipocytes. Cet effet physiologique est attendu, étant donné que ces adipokines sont sécrétées en cas d'hyperglycémie postprandiale pour réduire la prise alimentaire et augmenter la consommation de glucose pour réduire la glycémie (187; 611; 612). Par ailleurs, la stimulation insuline + glucose semble induire moins d'effet que la stimulation glucidique quant à la sécrétion de la leptine et de l'adiponectine. Ceci est fort probablement dû au fait que l'insuline induit l'entrée du glucose dans les cellules et stimule la lipogenèse qui consomme le glucose présent dans les milieux de culture. Ceci réduit l'impact de ce dernier sur la sécrétion de ces adipokines dans les surnageants adipocytaires.

Ces dissemblances dans la sécrétion des adipokines n'affectent par les effets pro-prolifératifs et pro-migratoires des adipocytes sur les CML dans tous les groupes de traitement. Ainsi, les surnageants d'adipocytes de tous les groupes de souris induisent le même niveau de prolifération des CML, sans différences significatives entre les deux types de stimulations dans un groupe d'un sexe donné. Par ailleurs, seuls les adipocytes des groupes DV et DA des souris mâles et femelles augmentent la migration des CML avec un effet plus marqué avec la stimulation glucidique. Cette dernière induit plus de migration du fait de l'absence d'induction des facteurs pro-migratoire stimulés par l'insuline.

Ces effets pro-prolifératif et pro-migratoire sont corrélés avec une augmentation accrue de la leptine qui stimule ces deux processus (2 à 6 fois) par rapport à

l'augmentation de l'adiponectine qui demeure modérée pour contrer les effets de la leptine. Ainsi la balance adiponectine/leptine qui contrôle la prolifération et la migration penche pour la leptine dans les deux cas de stimulation. Ces effets restent toutefois moins drastiques dans la migration des CML des cellules femelles du fait de l'implication possible d'ER α qui, comme discuté ci-dessus, induirait plus de sécrétion de facteurs de croissance qui débalanceraient le gradient migratoire.

Par ailleurs, nous nous attendions à un effet plus prononcé des surnageants des adipocytes du groupe DA mâle du fait de leur résistance à l'insuline et à ses effets. Cependant, ces surnageants induisent encore plus d'apoptose au niveau des CML, ce qui explique le moindre impact qu'attendu sur leur prolifération. De plus, la stimulation insuline + glucose des adipocyte du groupe DV des femelles induit aussi l'apoptose des CML. Nous pouvons penser que les adipocytes de ce groupe, provenant de souris qui n'ont présenté ni hyperglycémie ni hyperinsulinémie, ont subi un choc avec cette stimulation aiguë qui induit à la fois la lipogenèse et la sécrétion d'adipokine. Ces conditions aiguës peuvent induire l'apoptose des adipocytes qui sécrètent ainsi des facteurs apoptotiques dans leurs surnageants et induire l'apoptose des CML. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par le dosage des facteurs apoptotiques dans les surnageants correspondants.

En outre, dans un DT2 (hyperglycémie \pm hyper-insulinémie), la production de la résistine est augmentée par les adipocytes (401; 613). Cette adipokine, connue pour ses vertus insulino-résistante et hyperglycémiant qui réduisent la capture glucidique (614; 615), a été augmenté *in vivo* chez les souris alimentées avec la diète animale. De ce fait, la stimulation insulinique dans une condition de DT2 perd de son effet et la production d'agent pro-prolifératif et pro-migratoire est stimulée. Par ailleurs, le taux d'expression de CD36 est augmenté dans les CML stimulées avec les surnageants des adipocytes stimulés avec insuline + glucose mais diminué avec les surnageants des adipocytes stimulés avec glucose. Ceci peut aussi être relié à la production de résistine connue pour induire l'expression de CD36 (608; 609). Au contraire, le glucose seul diminuerait la résistine d'une part et augmenterait la lipogenèse d'autre part, ce qui diminuerait la présence de résistine et d'AG dans les surnageants. Ceci induit moins d'expression de CD36 dans les CML traitées dans de telles conditions de culture.

Finalement, l'augmentation du taux d'expression génique du récepteur d'insuline dans la condition de DT2 va en parallèle avec l'hypothèse de la diminution de la sensibilité à l'insuline, du fait de l'augmentation de la résistine, surtout dans les groupes DA des souris mâles et femelles. Par ailleurs, la stimulation induit le même taux d'expression du récepteur d'insuline dans les CML, étant donné que la stimulation réduit le taux d'AG dans les surnageants tout en stimulant la lipogenèse ce qui se répercute par une meilleure sensibilité à l'insuline et par moindre besoin de leurs récepteurs.

Uniquement dans le groupe des mâles sous DA qui sont insulino-résistants, la lipolyse peut être maintenue et les AG surtout saturés de la DA diminuent la sensibilité à l'insuline (519).

XII. Conclusion et perspectives

La nature du gras des diètes semble être un modulateur important dans l'établissement du DT2 chez les souris. De plus, notre modèle animal a montré une différence de réponse à ces diètes en fonction du sexe des souris. Ainsi, nous avons démontré le développement des altérations métaboliques en réponse aux diètes chez les femelles était décalées dans le temps, même avec quatre semaines supplémentaires de diète. De plus, les femelles développent une hyper-insulinémie au début des altérations à la différence des mâles qui étaient plutôt intolérants au glucose après 20 semaines de diète. La nature de la stimulation des adipocytes joue un rôle dans le profil des adipokines produites par le tissu adipeux, contribuant ainsi aux altérations métaboliques et cardiaques liées au DT2. Le récepteur des œstrogènes ER α influence l'activité de leur récepteur nucléaire spécifique PPAR γ 2 pour retardé l'apparition des altérations métaboliques. C'est ainsi que nous avons évalué un taux d'adiponectine plus élevé chez les femelles par rapport aux groupes mâles correspondants. Cette adipocytokine serait un des facteurs impliqué dans le retard de l'apparition du DT2 chez les femelles. Par ailleurs, nous avons mis en lumière une augmentation du taux d'AG dans le sérum des souris mâles et femelles sous diètes enrichies en gras, sans différence significative entre les groupes. Toutefois, la proportion de ces AG en lipides saturés et insaturés peut jouer un rôle dans les altérations observées, surtout que les AG saturés qui sont plus élevés dans la DA et sont plus délétères au niveau systémique que les AG mono-insaturés de la DV. Une analyse plus approfondie des AGL sanguins pourrait clarifier différents paramètres de notre modèle.

Par ailleurs, les gras dans les surnageants des adipocytes extraits de ces souris pourraient aussi avoir leur rôle dans les modulations de la migration et de la prolifération des CML *in vitro*. En effet, en fonction des stimulations insulinique et glycémique qui régulent l'homéostasie des adipocytes, ces cellules régulent la sécrétion des gras emmagasinés dans leur cytoplasme. Une étude plus élaborée de la contenance des surnageants en AG peut éclaircir cette hypothèse en plus de l'évaluation de l'intégrité de la voie de signalisation de l'insuline. De plus, les altérations fonctionnelles des CML, couplées à des modulations géniques, sont associées aux changements du profil de sécrétion des adipokines. Dans cette étude nous nous sommes concentrés sur la modulation de la leptine et de l'adiponectine. Cependant, d'autres adipokines tel que la résistine, la visfatine et l'apeline sont de plus en plus étudiées pour leur rôle dans les altérations vasculaires. D'autres analyses des surnageants adipocytaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les modulations au niveau des CML, surtout leur métamorphose en des cellules semblables à des cellules spumeuses.

Cette étude, jamais reportée dans la littérature, indique l'effet spécifique des adipocytes et non du tissu adipeux contenant d'autres types cellulaires dans les altérations des CML qui peuvent mener à l'athérosclérose. La nature des gras des diètes influencent la morphologie et la physiologie des adipocytes. Ces AG ligands, qui gouvernent l'activité de PPAR γ 2 des adipocytes, modulent le profil sécrétoire des adipokines soit des médiateurs importants de l'établissement des altérations vasculaires liées au DT2.

Les résultats dont nous disposons sur ces effets au moment de l'élaboration de ce rapport, n'ont pas répondu à toutes nos questions d'origine. Il nous est donc difficile de dresser des conclusions quant à l'effet des diètes sur PPAR γ 2 dans le développement des altérations cardiovasculaires du DT2. Nous avons établi une diminution de son expression dans le tissu gras abdominal des souris sous diète grasses. Mais est ce que cela reflète une diminution de son activité? Ou cela est-il dû à une augmentation de la masse adipeuse *in vivo*? Il serait donc nécessaire, pour émettre des conclusions à ce sujet, de travailler avec des adipocytes en présence d'agoniste ou d'antagoniste de ce récepteur nucléaire pour élucider les répercussions de son activité sur les CML. Cette partie de ce travail a été démarrée avec les surnageants d'adipocytes stimulés par la ciglitazone (agoniste des PPAR γ) ou par le T0070907 (antagoniste spécifique des PPAR γ) dont nous disposons. Les premiers résultats démontrent que l'activation de PPAR γ par son agoniste augmente la production de la leptine et celle de l'adiponectine et ce jusqu'à 10 fois par rapport aux autres stimulations. Par ailleurs, l'antagoniste spécifique de ce récepteur diminue la sécrétion des deux adipokines dans les surnageants des adipocytes des mâles et des femelles dans tous les groupes de diètes. L'effet, remarquable à ce niveau, est que l'impact des diètes sur ces stimulations est plus modéré, et la modulation des adipokines dans les surnageants devient comparable. Les répercussions de ces modulations sur les CML restent encore à évaluer.

XIII. Et si tout commençait par la fin...

Si des réponses à plusieurs questions émergent de ces travaux auraient pu être données, il aurait été intéressant de mieux cerner le rôle du tissu adipeux dans le développement du DT2 lié à l'obésité et aux altérations cardiovasculaires associées. Ces études, réalisées chez la souris, ont démontré que ce modèle se prête bien aux études sur les altérations métaboliques liées à un apport lipidique. Cependant, les études chez l'homme ne corroborent pas tous les résultats observés chez l'animal, et ce principalement à cause des différences dans la méthodologie employée. En effet, chez l'humain, les choix alimentaires sont plus variables que dans notre modèle et, même si chez certains individus, les aliments sont principalement riches en gras, l'alimentation peut être plus hétérogène. De plus, l'hétérogénéité génétique chez l'humain expliquerait cette divergence par rapport aux souris, notamment le polymorphisme qui existe au niveau des régulateurs de l'homéostasie lipidique et glucidique comme celle des PPAR γ 2.

Nous pouvons chercher à déterminer si les variants des PPAR γ trouvés chez l'humain contribuent à moduler la réponse cardiovasculaire aux gras administrés aux souris. Ceci pourrait être effectué chez des animaux porteurs du variant hypo-actif Pro12Ala de PPAR γ 2, mais aussi chez les animaux possédant un variant hyperactif des PPAR γ : Pro113Gln.

Après un régime alimentaire de 20 semaines, il semblerait que le diabète, chez les souris soumises à la diète enrichie en matières grasses, varierait entre les groupes correspondants. L'activité pancréatique, modulée en grande partie par la nature des diètes, est fort possiblement impliquée dans ce processus. Ceci devra être vérifié par le dosage de son activité au niveau cellulaire et par la réalisation de clamps euglycémiques *in vivo* dans un autre groupe de souris pour essayer de clarifier l'activité des cellules β pancréatiques après l'ingestion des diètes. En effet, cela nous permettrait de mieux comprendre les différences du développement du DT2 entre les femelles, qui présentent tout d'abord une hyper-insulinémie, et les mâles, qui présentent une hyperglycémie au début de la pathologie. En effet, ER α , les AG, l'adiponectine, la leptine et d'autres facteurs influencent la viabilité et les fonctions de ces cellules. Ainsi, nous pourrions discerner un vrai DT2 d'un diabète de type 1.

Sur le plan systémique, une analyse plus approfondie sur la régulation de la sécrétion d'adipocytokines, connues pour affecter les fonctions cardiovasculaires et glycémiques comme le TNF α , l'IL-6, le RBP-4, la visfatine ainsi que la résistine devrait être approfondi. En particulier, cette dernière pourrait réguler la fonction des récepteurs de l'insuline par une voie impliquant la 5'-AMPK, voie rendue responsable d'une

hypertrophie cardiaque et de l'altération des fonctions vasculaires. Également, il serait intéressant d'évaluer le taux circulant des hormones sexuelles, la testostérone et l'œstrogène, du fait de leur importance dans ces transformations. De plus, l'analyse histologique des adipocytes, des cardiomyocytes et des vaisseaux peut apporter d'autres clarifications à notre modèle. En effet, l'évaluation de la contenance en cardiolipine pour évaluer l'activité mitochondriale et en récepteurs de leptine, d'adiponectine et d'insuline dans ces tissus consommateurs de glucose, serait une étape essentielle dans la vérification des conclusions établies à ce sujet.

Par ailleurs, la capture cardiaque du glucose aux fins d'évaluer la charge glucidique cardiaque dans ces altérations pourrait être évaluée en PETScan. Ceci pourra se faire en réglant à la fois les problèmes technologiques liés à la taille de l'animal vis-à-vis de la machine utilisée chez l'humain, mais aussi le protocole de stimulation par l'insuline et le glucose en présence de l'analgésie qui doit être efficace pour éviter toute stimulation catécholaminergique associée à une douleur lors du cathétérisme de la veine caudale. Finalement, nous avons identifié par échocardiographie que les souris sous DA présentent une dysfonction cardiaque systolo-diastolique, et nous pensons que les pressions de remplissage du ventricule gauche sont augmentées. Ceci pourrait être vérifié dans des expériences futures par la réalisation de courbes pression/volume ventriculaire par cathétérisme invasif. Cela nous permettrait de mieux caractériser une éventuelle cardiomyopathie diabétique.

XIV. Épilogue

Le questionnement d'origine menant à approfondir une réflexion par l'élaboration de ce projet était de savoir si nous devrions tenter de soigner les répercussions d'une société industrialisée et des facteurs de risques qu'elles génère, ou plutôt de tenter de changer notre mode de vie et de réduire les effets de la sédentarité et de la nourriture hypercalorique. Comme mes moyens étaient limités à l'époque pour imposer un mode de vie sain à toute la planète, j'ai choisi d'étudier ce modèle de souris afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces facteurs de risques et de mieux cibler les processus responsables pour les traitements futurs.

Le travail que j'ai proposé peut paraître surprenant ou même déroutant face aux données de la littérature tant il diffère des travaux traditionnels dans le domaine des altérations métaboliques et des paramètres cardiovasculaires associés. Cependant, ce projet ne doit pas être considéré comme un produit fini visant à répondre à une question intéressant la recherche, mais plutôt comme un cheminement de recherche allant des aspects cellulaires des altérations physiologiques à la compréhension de facteurs systémiques dans l'établissement des troubles métaboliques et des pathologies associées. Il s'agit davantage d'un questionnement articulant la théorie et la pratique visant à mettre en évidence des interactions cellulaires au niveau d'un organisme incorporant plusieurs facteurs exogènes. Étudier le rôle du tissu adipeux et de son interaction avec d'autres organes de l'organisme est un chantier dans lequel, nous l'espérons, cette thèse contribuera à poser un pavé. Elle ouvre de nombreuses perspectives et encourage son auteur à poursuivre un processus de recherche plus élaboré.

Chapitre V. BIBLIOGRAPHIE

1. Marieb EN: Anatomie Et Physiologie Humaines. *DeBoeck Université*, 1999
2. O'Brien SF, McKendrick JD, Radomski MW, Davidge ST, Russell JC: Vascular wall reactivity in conductance and resistance arteries: differential effects of insulin resistance. *Can J Physiol Pharmacol* 76:72-76, 1998
3. Williams JK, Heistad DD: [The vasa vasorum of the arteries]. *J Mal Vasc* 21 Suppl C:266-269, 1996
4. Michel JB: [Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system]. *Pathol Biol (Paris)* 46:181-189, 1998
5. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980
6. Nathan C, Xie QW: Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-918, 1994
7. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I: Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 168:81-88, 2000
8. Sanderson MJ, Delmotte P, Bai Y, Perez-Zogbhi JF: Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. *Proc Am Thorac Soc* 5:23-31, 2008
9. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-1489, 1987
10. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4651-4655, 1991
11. Vanhoutte PM: The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med* 319:512-513, 1988
12. Taylor CT, Moncada S: Nitric Oxide, Cytochrome C Oxidase, and the Cellular Response to Hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009
13. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S: Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* 157:527-536, 2009
14. Moncada S, Amezcua JL: Prostacyclin, thromboxane A₂ interactions in haemostasis and thrombosis. *Haemostasis* 8:252-265, 1979
15. Landry Y, Gies J: PHARMACOLOGIE: Des cibles vers l'indication thérapeutique. 2003
16. Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett JC, Jr., Vanhoutte PM: Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 165:333-334, 1989
17. Masaki T, Yanagisawa M, Goto K: Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12:391-421, 1992
18. Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM: Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res* 76:1003-1010, 1995

19. Schini VB, Kim ND, Vanhoutte PM: The basal and stimulated release of EDRF inhibits the contractions evoked by endothelin-1 and endothelin-3 in aortae of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7:S267-271, 1991
20. Nakashima M, Vanhoutte PM: Endothelin-1 and -3 cause endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 265:H2137-2141, 1993
21. Miller VM, Komori K, Burnett JC, Jr., Vanhoutte PM: Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am J Physiol* 257:H1127-1131, 1989
22. Halayko AJ, Rector E, Stephens NL: Characterization of molecular determinants of smooth muscle cell heterogeneity. *Can J Physiol Pharmacol* 75:917-929, 1997
23. Chapman JTMJLLJ: **L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques.** Édition Masson., 2003
24. Owens GK: Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75:487-517, 1995
25. Hanahan D: Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48-50, 1997
26. Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, Betsholtz C: Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 9:407-411, 1998
27. FATTOUM: Régulation de la contraction du muscle lisse *Médecine sciences* 13:777-789, 1997
28. Holifield B, Helgason T, Jemelka S, Taylor A, Navran S, Allen J, Seidel C: Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation? *J Clin Invest* 97:814-825, 1996
29. Campbell GR, Campbell JH: The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann N Y Acad Sci* 598:143-158, 1990
30. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M: Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 281:421-433, 1995
31. Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE: Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec* 258:1-14, 2000
32. Hanke H, Lenz C, Finking G: The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review. *Acta Chir Belg* 101:162-169, 2001
33. Goodman DS: George Lyman Duff memorial lecture. Cholesterol revisited. Molecule, medicine, and media. *Arteriosclerosis* 9:430-438, 1989
34. Giral P: [Atheroma]. *Rev Prat* 48:99-106, 1998
35. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999
36. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W: Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 354:1234-1241, 1999
37. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W: Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and

its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100:2680-2690, 1997

38. Gimbrone MA, Jr.: Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 82:722-726, 1999

39. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251:788-791, 1991

40. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994

41. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA: Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 14:753-759, 1994

42. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME: Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90:1168-1172, 1992

43. Nickenig G, Harrison DG: The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105:393-396, 2002

44. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842, 1992

45. Griendling KK, FitzGerald GA: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108:1912-1916, 2003

46. Milstien S, Katusic Z: Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263:681-684, 1999

47. Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ: Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 3:279-288, 2003

48. Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT: Part I: pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med* 8:571-580, 2002

49. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I: Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 106:1439-1441, 2002

50. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ: A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106:913-919, 2002

51. Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF: NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension* 40:755-762, 2002

52. Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL: Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39:479-485, 2002

53. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H: Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106:3073-3078, 2002
54. Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C: Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 59:1466-1472, 2001
55. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:1842-1847, 1998
56. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T: Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99:1141-1146, 1999
57. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Boger R: Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62:339-345, 2002
58. Sanz J, Fayad ZA: Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451:953-957, 2008
59. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97:1916-1923, 1996
60. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL: PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40:866-871, 2002
61. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A, Neves MF, Schiffrin EL: Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation* 105:2296-2302, 2002
62. Schiffrin EL, Touyz RM: Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol* 42:911-913, 2003
63. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM: Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 101:1653-1659, 2000
64. Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL: Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens* 19:415-420, 2001
65. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF, Jr., Creager MA: Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2392-2398, 2003
66. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Piccoli A, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Salvetti M, De Ciuceis C, Tiberio GA, Giulini SM, Sleiman I, Monteduro C, Rosei EA: Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 19:913-919, 2001

67. Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A: Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. *Circulation* 106:3037-3043, 2002
68. Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, Savoia C, Viridis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL: Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension* 43:399-404, 2004
69. Monnick SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, Smit AJ, Veeger NJ, Crijns HJ, van Gilst WH: Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med* 50:19-24, 2002
70. Yildiz A, Oflaz H, Pusuroglu H, Mercanoglu F, Genchallac H, Akkaya V, Ikizler TA, Sever MS: Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 41:616-623, 2003
71. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A: Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 94:1298-1303, 1996
72. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340:1111-1115, 1992
73. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Haring HU: Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 101:1780-1784, 2000
74. Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, Stuehlinger M, Lin KY, Cooke JP, Morrow JD, Ridker PM, Rifai N, Miller E, Witztum JL, Mietus-Snyder M: Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation* 108:1059-1063, 2003
75. Raitakari M, Ilvonen T, Ahotupa M, Lehtimaki T, Harmoinen A, Suominen P, Elo J, Hartiala J, Raitakari OT: Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: role of plasma glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:124-128, 2004
76. Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Best MJ, Taylor RR, O'Driscoll JG: Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: pooled analysis of diverse patient populations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2679-2687, 2003
77. Oida K, Ebata K, Kanehara H, Suzuki J, Miyamori I: Effect of cilostazol on impaired vasodilatory response of the brachial artery to ischemia in smokers. *J Atheroscler Thromb* 10:93-98, 2003
78. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ: Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105:311-320, 2000
79. Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ: Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol* 16:1931-1942, 2002

80. Osman AA, Pendergrass M, Koval J, Maezono K, Cusi K, Pratipanawatr T, Mandarino LJ: Regulation of MAP kinase pathway activity in vivo in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E992-999, 2000
81. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R: Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106:466-472, 2002
82. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A: Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87:432-438, 1991
83. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y: Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 108:472-478, 2003
84. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F: Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 95:1783-1790, 1997
85. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA: Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 97:1695-1701, 1998
86. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9114-9119, 1996
87. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S: New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 108:1917-1923, 2003
88. Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874, 2002
89. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R: Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 76:980-986, 1995
90. Mehta JL, Li D: Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor. *J Am Coll Cardiol* 39:1429-1435, 2002
91. Morawietz H, Duerrschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J: Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284:961-965, 2001
92. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerrschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J: Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 100:899-902, 1999
93. Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Lusis AJ: Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 102:75-81, 2000
94. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924, 1989

95. Hodis HN, Mack WJ: Triglyceride-rich lipoproteins and progression of atherosclerosis. *Eur Heart J* 19 Suppl A:A40-44, 1998
96. Nordestgaard BG, Nielsen LB: Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 5:252-257, 1994
97. Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL: Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11:451-456, 2000
98. Steinberg D: A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 131 Suppl:S5-7, 1997
99. Young SG, Parthasarathy S: Why are low-density lipoproteins atherogenic? *West J Med* 160:153-164, 1994
100. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N: Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *J Cell Biol* 96:1677-1689, 1983
101. Williams KJ, Tabas I: The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:551-561, 1995
102. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2:275-281, 1998
103. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF: Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897, 1998
104. Mozes G, Mohacsi T, Gloviczki P, Menawat S, Kullo I, Spector D, Taylor J, Crotty TB, O'Brien T: Adenovirus-mediated gene transfer of macrophage colony stimulating factor to the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1157-1163, 1998
105. Antonov AS, Munn DH, Kolodgie FD, Virmani R, Gerrity RG: Aortic endothelial cells regulate proliferation of human monocytes in vitro via a mechanism synergistic with macrophage colony-stimulating factor. Convergence at the cyclin E/p27(Kip1) regulatory checkpoint. *J Clin Invest* 99:2867-2876, 1997
106. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al.: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386:292-296, 1997
107. Schonbeck U, Libby P: CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 89:1092-1103, 2001
108. Tedgui A, Mallat Z: [Inflammation and atherosclerosis]. *Nephrologie* 24:411-414, 2003
109. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS: Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 88:1291-1298, 2001
110. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94:2493-2503, 1994
111. Pryshchep S, Sato K, Goronzy JJ, Weyand CM: T cell recognition and killing of vascular smooth muscle cells in acute coronary syndrome. *Circ Res* 98:1168-1176, 2006

112. Mikko M, Fredriksson K, Wahlstrom J, Eriksson P, Grunewald J, Skold CM: Human T cells stimulate fibroblast-mediated degradation of extracellular matrix in vitro. *Clin Exp Immunol* 151:317-325, 2008
113. White MC, McHowat J: Protease activation of calcium-independent phospholipase A2 leads to neutrophil recruitment to coronary artery endothelial cells. *Thromb Res* 120:597-605, 2007
114. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A: Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101:2450-2453, 2000
115. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W: Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 73:470-480, 2007
116. Li J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM: Peroxynitrite induces apoptosis and decline in intracellular free Mg with concomitant elevation in [Ca²⁺]_i in rat aortic smooth muscle cells: possible roles of extracellular and intracellular magnesium ions in peroxynitrite-induced cell death. *Drug Metab Lett* 1:85-89, 2007
117. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424, 2007
118. Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:19-27, 1996
119. Mallat Z, Tedgui A: Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 88:998-1003, 2001
120. Weissberg PL: Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart* 83:247-252, 2000
121. Argmann CA, Sawyez CG, Li S, Nong Z, Hegele RA, Pickering JG, Huff MW: Human smooth muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1290-1296, 2004
122. Davies JD, Carpenter KL, Challis IR, Figg NL, McNair R, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM: Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280:3911-3919, 2005
123. Gough PJ, Greaves DR, Suzuki H, Hakkinen T, Hiltunen MO, Turunen M, Herttuala SY, Kodama T, Gordon S: Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:461-471, 1999
124. Stein O, Shiloni E, Stein Y: Effect of TNF on triacylglycerol in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1082:33-36, 1991
125. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM: Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:489-494, 2003
126. Shanahan CM, Weissberg PL: Smooth muscle cell phenotypes in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol* 10:507-513, 1999

127. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA: Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13531-13536, 2003
128. Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, Reidy MA, Cokay MS, Peters H, Huttner I: Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. Biochemical and morphologic studies. *Lab Invest* 65:459-470, 1991
129. Goldberg ID, Stemerman MB, Ransil BJ, Fuhro RL: In vivo aortic muscle cell growth kinetics. Differences between thoracic and abdominal segments after intimal injury in the rabbit. *Circ Res* 47:182-189, 1980
130. Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM: Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *J Clin Invest* 91:1469-1480, 1993
131. Artwohl M, Lindenmair A, Roden M, Waldhausl WK, Freudenthaler A, Klosner G, Ilhan A, Luger A, Baumgartner-Parzer SM: Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure. *Atherosclerosis* 202:351-362, 2009
132. Okura Y, Brink M, Itabe H, Scheidegger KJ, Kalangos A, Delafontaine P: Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 102:2680-2686, 2000
133. Chatterjee S: Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1523-1533, 1998
134. Auge N, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Levade T: Sphingomyelin metabolites in vascular cell signaling and atherogenesis. *Prog Lipid Res* 39:207-229, 2000
135. Suc I, Meilhac O, Lajoie-Mazenc I, Vandaele J, Jurgens G, Salvayre R, Negre-Salvayre A: Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *FASEB J* 12:665-671, 1998
136. Cifuentes M, Albala C, Rojas CV: Differences in lipogenesis and lipolysis in obese and non-obese adult human adipocytes. *Biol Res* 41:197-204, 2008
137. Gilchrist JA, Best CH, Banting FG: Observations with Insulin on Department of Soldiers' Civil Re-Establishment Diabetics. *Can Med Assoc J* 13:565-572, 1923
138. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA: Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 12:141-146, 1922
139. Brown H, Sanger F, Kitai R: The structure of pig and sheep insulins. *Biochem J* 60:556-565, 1955
140. De Meyts P: Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* 26:1351-1362, 2004
141. Clark MG, Wallis MG, Barrett EJ, Vincent MA, Richards SM, Clerk LH, Rattigan S: Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E241-258, 2003
142. Zeng G, Quon MJ: Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98:894-898, 1996
143. Gaudreault N, Santure M, Pitre M, Nadeau A, Marette A, Bachelard H: Effects of insulin on regional blood flow and glucose uptake in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Metabolism* 50:65-73, 2001

144. Fleming I, Busse R: Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1-12, 2003
145. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ: Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 276:30392-30398, 2001
146. Takahashi S, Mendelsohn ME: Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 278:30821-30827, 2003
147. Hartell NA, Archer HE, Bailey CJ: Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem Pharmacol* 69:781-790, 2005
148. Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ: Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101:1539-1545, 2000
149. Banskota NK, Taub R, Zellner K, King GL: Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* 3:1183-1190, 1989
150. Becker AB, Roth RA: Insulin receptor structure and function in normal and pathological conditions. *Annu Rev Med* 41:99-115, 1990
151. Kido Y, Nakae J, Accili D: Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 86:972-979, 2001
152. Capeau J: [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)* 19:834-839, 2003
153. Le Roith D, Zick Y: Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24:588-597, 2001
154. Leng Y, Karlsson HK, Zierath JR: Insulin signaling defects in type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 5:111-117, 2004
155. Zierath JR, Kawano Y: The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17:385-398, 2003
156. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR: Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96, 2006
157. Taniguchi CM, Tran TT, Kondo T, Luo J, Ueki K, Cantley LC, Kahn CR: Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha suppresses insulin action via positive regulation of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12093-12097, 2006
158. Avruch J: Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182:31-48, 1998
159. Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212, 1990
160. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR: Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931-943, 1999

161. King MJ, Sharma RP, Sale GJ: Site-specific dephosphorylation and deactivation of the human insulin receptor tyrosine kinase by particulate and soluble phosphotyrosyl protein phosphatases. *Biochem J* 275 (Pt 2):413-418, 1991
162. Capeau J: Signalisation insuline en physiologie et pathologie. *Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie-France*, 2006
163. King GL, Johnson SM: Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* 227:1583-1586, 1985
164. Hachiya HL, Halban PA, King GL: Intracellular pathways of insulin transport across vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 255:C459-464, 1988
165. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271:13018-13022, 1996
166. Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J: Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47:515-522, 1998
167. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668, 1996
168. Qi C, Pekala PH: Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:128-135, 2000
169. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM: Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 94:1543-1549, 1994
170. Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I: Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 86:E94-104, 2008
171. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M: Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 114:183-194, 2008
172. OMS: <http://www.who.int/fr/>.
173. Association AD: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 30 Suppl 1:S42-47, 2007
174. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl 1:S62-67, 2009
175. *Committee CDACPGE*: Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes and Other Dysglycemic Categories. *Canadian Diabetes Association 2008 Clinical Practice Guidelines*, 2008
176. Mahler RJ, Adler ML: Clinical review 102: Type 2 diabetes mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1165-1171, 1999
177. Poirier P, Tremblay A, Broderick T, Catellier C, Tancrede G, Nadeau A: Impact of moderate aerobic exercise training on insulin sensitivity in type 2 diabetic men treated with oral hypoglycemic agents: is insulin sensitivity enhanced only in nonobese subjects? *Med Sci Monit* 8:CR59-65, 2002
178. Weir GC, Bonner-Weir S: Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S16-21, 2004

179. Cerasi E, Ktorza A: [Anatomical and functional plasticity of pancreatic beta-cells and type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 23:885-894, 2007
180. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI: Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341:240-246, 1999
181. Wolf G: Role of fatty acids in the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nutr Rev* 66:597-600, 2008
182. White MF: IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E413-422, 2002
183. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336, 2002
184. Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF: Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* 107:181-189, 2001
185. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF: c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278:2896-2902, 2003
186. Petersen KF, Shulman GI: Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90:11G-18G, 2002
187. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295, 2002
188. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343, 2002
189. Cariou B, Perdereau D, Cailliau K, Browaeys-Poly E, Bereziat V, Vasseur-Cognet M, Girard J, Burnol AF: The adapter protein ZIP binds Grb14 and regulates its inhibitory action on insulin signaling by recruiting protein kinase Czeta. *Mol Cell Biol* 22:6959-6970, 2002
190. Timsit J, Bellanne-Chantelot C, Dubois-Laforgue D, Velho G: Diagnosis and management of maturity-onset diabetes of the young. *Treat Endocrinol* 4:9-18, 2005
191. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, Vaillant E, Benmezroua Y, Durand E, Bakaher N, Delannoy V, Vaxillaire M, Cook T, Dallinga-Thie GM, Jansen H, Charles MA, Clement K, Galan P, Hercberg S, Helbecque N, Charpentier G, Prentki M, Hansen T, Pedersen O, Urrutia R, Melloul D, Froguel P: Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4807-4812, 2005
192. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Neramoen I, Eide SA, Grevle L, Bjorkhaug L, Sagen JV, Aksnes L, Sovik O, Lombardo D, Molven A, Njolstad PR: Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet* 38:54-62, 2006
193. Supplement 1. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2000. *Diabetes Care* 23 Suppl 1:S1-116, 2000

194. Sasaki A: Assessment of the new criteria for diabetes mellitus according to 10-year relative survival rates. *Diabetologia* 20:195-198, 1981
195. Poirier P, Mawhinney S, Grondin L, Tremblay A, Broderick T, Cleroux J, Catellier C, Tancrede G, Nadeau A: Prior meal enhances the plasma glucose lowering effect of exercise in type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc* 33:1259-1264, 2001
196. Turner RC: The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 21 Suppl 3:C35-38, 1998
197. Abbasi F, Brown BW, Jr., Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM: Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 40:937-943, 2002
198. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC: Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:3120-3127, 2002
199. Sosenko JM, Breslow JL, Miettinen OS, Gabbay KH: Hyperglycemia and plasma lipid levels: a prospective study of young insulin-dependent diabetic patients. *N Engl J Med* 302:650-654, 1980
200. Steinberg D, Gotto AM, Jr.: Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside. *JAMA* 282:2043-2050, 1999
201. Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, Leon MN, Bernardi VH, Fuster V, Fallon JT: Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 102:2180-2184, 2000
202. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510-2516, 1993
203. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR: Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35:771-776, 1992
204. Gunnett CA, Heistad DD, Faraci FM: Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke* 34:2970-2974, 2003
205. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB: Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 89:10-18, 1992
206. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ: Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 274:32512-32519, 1999
207. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV: Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293:2449-2452, 2001
208. Tumosa N: Eye disease and the older diabetic. *Clin Geriatr Med* 24:515-527, vii, 2008
209. Grimaldi A: [Type 2 diabetes of the adult]. *Rev Prat* 57:531-536, 2007
210. Soldatos G, Cooper ME: Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms. *Diabetes Res Clin Pract* 82 Suppl 1:S75-79, 2008

211. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T: Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 25:496-501, 1983
212. Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C: Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 4:859-863, 1989
213. Rossing P, Rossing K, Jacobsen P, Parving HH: Unchanged incidence of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes* 44:739-743, 1995
214. Ballard DJ, Humphrey LL, Melton LJ, 3rd, Frohnert PP, Chu PC, O'Fallon WM, Palumbo PJ: Epidemiology of persistent proteinuria in type II diabetes mellitus. Population-based study in Rochester, Minnesota. *Diabetes* 37:405-412, 1988
215. Stevens MJ, Feldman EL, Greene DA: The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabet Med* 12:566-579, 1995
216. Boulton AJ, Gries FA, Jervell JA: Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Med* 15:508-514, 1998
217. Diabète Québec. <http://www.diabete.qc.ca/htm>.
218. Wilmsen HM, Ciaraldi TP, Carter L, Reehman N, Mudaliar SR, Henry RR: Thiazolidinediones upregulate impaired fatty acid uptake in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E354-362, 2003
219. Zierath JR, Ryder JW, Doebber T, Woods J, Wu M, Ventre J, Li Z, McCrary C, Berger J, Zhang B, Moller DE: Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPAR γ agonist) action. *Endocrinology* 139:5034-5041, 1998
220. Spiegelman BM: PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507-514, 1998
221. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 270:12953-12956, 1995
222. Suter SL, Nolan JJ, Wallace P, Gumbiner B, Olefsky JM: Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 15:193-203, 1992
223. Sanofi-Aventis Canada Inc.
224. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556, 2004
225. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR: Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242-256, 2007
226. Jacques Poirier MC, Romain-K Gherardi, Jean-François Bernaudin, Jean-Michel André: Histologie : Les tissus. *Masson*, 2006
227. Hauner H, Entenmann G: Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *Int J Obes* 15:121-126, 1991
228. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, Cushman SW, Periwai V: Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 5:e1000324, 2009
229. Cannon B, Nedergaard J: Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359, 2004
230. Clement K, Ferre P: Genetics and the pathophysiology of obesity. *Pediatr Res* 53:721-725, 2003

231. Cummings DE, Schwartz MW: Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med* 54:453-471, 2003
232. Nedergaard J, Cannon B: The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* 11:268-272
233. Digby JE, Montague CT, Sewter CP, Sanders L, Wilkison WO, O'Rahilly S, Prins JB: Thiazolidinedione exposure increases the expression of uncoupling protein 1 in cultured human preadipocytes. *Diabetes* 47:138-141, 1998
234. Hirsch J, Batchelor B: Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5:299-311, 1976
235. Tchernof A: Visceral adipocytes and the metabolic syndrome. *Nutr Rev* 65:S24-29, 2007
236. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, Bernard S, Arner P: Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 59:105-109, 2010
237. Kissebah AH, Krakower GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 74:761-811, 1994
238. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, Rheaume C, Tchernof A: Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond)* 32:283-291, 2008
239. Blaak E: Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4:499-502, 2001
240. Isganaitis E, Lustig RH: Fast food, central nervous system insulin resistance, and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2451-2462, 2005
241. Prentice AM, Jebb SA: Fast foods, energy density and obesity: a possible mechanistic link. *Obes Rev* 4:187-194, 2003
242. Shi Y, Burn P: Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* 3:695-710, 2004
243. Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R: Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2:309-320, 2002
244. Tang QQ, Otto TC, Lane MD: Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9607-9611, 2004
245. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809, 1998
246. Ruehl M, Erben U, Schuppan D, Wagner C, Zeller A, Freise C, Al-Hasani H, Loesekann M, Notter M, Wittig BM, Zeitz M, Dieterich W, Somasundaram R: The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. *J Biol Chem* 280:38537-38543, 2005
247. Tang QQ, Otto TC, Lane MD: Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:44-49, 2003
248. Fleenor D, Arumugam R, Freemark M: Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Horm Res* 66:101-110, 2006
249. Park KW, Halperin DS, Tontonoz P: Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metab* 8:454-457, 2008

250. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM: Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10:974-984, 1996
251. Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, Dani C, Negrel R, Ailhaud G: Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol* 160:149-156, 2000
252. Holly J, Perks C: The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology* 83:154-160, 2006
253. Rosen ED, MacDougald OA: Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896, 2006
254. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lin A, Lisanti MP, Scherer PE: Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* 274:35630-35638, 1999
255. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A: An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem* 274:10071-10078, 1999
256. zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ: Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol* 5:1, 2005
257. Gaillard D, Wabitsch M, Pipy B, Negrel R: Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. *J Lipid Res* 32:569-579, 1991
258. Joyner JM, Hutley LJ, Cameron DP: Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences. *J Endocrinol* 166:145-152, 2000
259. Cao Z, Umek RM, McKnight SL: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552, 1991
260. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR: Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16:4128-4136, 1996
261. Bujalska I, Shimojo M, Howie A, Stewart PM: Human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue. *Steroids* 62:77-82, 1997
262. Stewart PM, Tomlinson JW: Cortisol, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. *Trends Endocrinol Metab* 13:94-96, 2002
263. Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, Walker BR: Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology* 141:560-563, 2000
264. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR: Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1418-1421, 2001
265. Arner P: Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Curr Mol Med* 5:333-339, 2005
266. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT: Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 46:1369-1379, 2005

267. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9:168-181, 1995
268. Kawai M, Mushiake S, Bessho K, Murakami M, Namba N, Kokubu C, Michigami T, Ozono K: Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalpha. *Biochem Biophys Res Commun* 363:276-282, 2007
269. Yang J, Croniger CM, Lekstrom-Himes J, Zhang P, Fenyus M, Tenen DG, Darlington GJ, Hanson RW: Metabolic response of mice to a postnatal ablation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 280:38689-38699, 2005
270. Wang ZX, Jiang CS, Liu L, Wang XH, Jin HJ, Wu Q, Chen Q: The role of Akt on arsenic trioxide suppression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Cell Res* 15:379-386, 2005
271. Miard S, Fajas L: Atypical transcriptional regulators and cofactors of PPARgamma. *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1:S10-12, 2005
272. Kim JB, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10:1096-1107, 1996
273. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4333-4337, 1998
274. Kadesch T: Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ* 4:49-55, 1993
275. Boucherle A: [Fenofibrate: chemical development and differences with clofibrate (author's transl)]. *Nouv Presse Med* 9:3721-3723, 1980
276. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al.: Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317:1237-1245, 1987
277. Issemann I, Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650, 1990
278. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W: The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43, 1996
279. Auwerx J: Regulation of gene expression by fatty acids and fibric acid derivatives: an integrative role for peroxisome proliferator activated receptors. The Belgian Endocrine Society Lecture 1992. *Horm Res* 38:269-277, 1992
280. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM: Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318-4323, 1997
281. Roberts R, Moffat G, Ashby J: Exposure to peroxisome proliferators: reassessment of the potential carcinogenic hazard. *Environ Health Perspect* 109:A462-464, 2001
282. Bardot O, Aldridge TC, Latruffe N, Green S: PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun* 192:37-45, 1993

283. Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W: Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 77:67-76, 1993
284. Green S: Nuclear receptors and chemical carcinogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 13:251-255, 1992
285. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S: The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* 11:37-47, 1993
286. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-819, 1995
287. Mukherjee R, Jow L, Noonan D, McDonnell DP: Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51:157-166, 1994
288. Palmer CN, Hsu MH, Griffin HJ, Johnson EF: Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem* 270:16114-16121, 1995
289. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37:907-925, 1996
290. Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S: The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11:433-439, 1992
291. Aldridge TC, Tugwood JD, Green S: Identification and characterization of DNA elements implicated in the regulation of CYP4A1 transcription. *Biochem J* 306 (Pt 2):473-479, 1995
292. Muerhoff AS, Griffin KJ, Johnson EF: The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibric acid. *J Biol Chem* 267:19051-19053, 1992
293. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W: Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879-887, 1992
294. Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK: Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem* 268:26817-26820, 1993
295. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM: Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7355-7359, 1994
296. Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP: The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11012-11016, 1994
297. Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J: Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* 270:13470-13475, 1995

298. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W: Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2160-2164, 1993
299. Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ: Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 18:2029-2033, 1997
300. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V: How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17:554-556, 2001
301. Laudet V: Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19:207-226, 1997
302. Aranda A, Pascual A: Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304, 2001
303. Ferre P: The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53 Suppl 1:S43-50, 2004
304. Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688, 1999
305. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK: Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7921-7925, 1995
306. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789, 1997
307. Li D, Kang Q, Wang DM: Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma), a novel coactivator of PPARgamma that promotes adipogenesis. *Mol Endocrinol* 21:2320-2333, 2007
308. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS: Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 272:20230-20235, 1997
309. Sundvold H, Lien S: Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem Biophys Res Commun* 287:383-390, 2001
310. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J: PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438:55-60, 1998
311. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK: Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7614-7619, 1998
312. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366, 1996
313. Bortolotto JW, Margis R, Ferreira AC, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM: Adipose tissue distribution and quantification of PPARbeta/delta and PPARgamma1-3

- mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. *Obes Surg* 17:934-940, 2007
314. Lupi R, Del Guerra S, Marselli L, Bugliani M, Boggi U, Mosca F, Marchetti P, Del Prato S: Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR γ 2 in the modulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E560-567, 2004
315. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A: PPAR γ 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 3:e64, 2007
316. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B: Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573-25580, 1998
317. Bocher V, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B: [PPARs activators and regulation of lipid metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*:23-32, 2001
318. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B: CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101:2411-2417, 2000
319. Kersten S, Wahli W: Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS* 89:141-151, 2000
320. Xu C, Wang LL, Liu HY, Zhou XB, Cao YL, Li S: C333H, a novel PPAR α / γ dual agonist, has beneficial effects on insulin resistance and lipid metabolism. *Acta Pharmacol Sin* 27:223-228, 2006
321. Kamijo Y, Hora K, Kono K, Takahashi K, Higuchi M, Ehara T, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T: PPAR α protects proximal tubular cells from acute fatty acid toxicity. *J Am Soc Nephrol* 18:3089-3100, 2007
322. Yan ZC, Liu DY, Zhang LL, Shen CY, Ma QL, Cao TB, Wang LJ, Nie H, Zidek W, Tepel M, Zhu ZM: Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- δ . *Biochem Biophys Res Commun* 354:427-433, 2007
323. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156, 1994
324. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ : adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135:798-800, 1994
325. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM: mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8:1224-1234, 1994
326. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM: PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351-357, 1995
327. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J: PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-

- specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336-5348, 1996
328. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4543-4547, 2004
329. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM: PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595, 1999
330. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM: PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617, 1999
331. Agarwal AK, Garg A: A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 87:408-411, 2002
332. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S: Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883, 1999
333. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T: PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 51:3586-3590, 2002
334. Ludtke A, Buettner J, Wu W, Muchir A, Schroeter A, Zinn-Justin S, Spuler S, Schmidt HH, Worman HJ: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C190S mutation causes partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2248-2255, 2007
335. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD, Dixon AK, Dunne F, Boiani R, Cinti S, Vidal-Puig A, Karpe F, Chatterjee VK, O'Rahilly S: Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 52:910-917, 2003
336. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE: Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97:2553-2561, 1996
337. Hamann A, Benecke H, Le Marchand-Brustel Y, Susulic VS, Lowell BB, Flier JS: Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. *Diabetes* 44:1266-1273, 1995
338. Spiegelman BM, Hotamisligil GS: Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. *Cell* 73:625-627, 1993
339. Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ: Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130:43-52, 1992
340. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T: Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101:1354-1361, 1998
341. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994

342. Considine RV: Weight regulation, leptin and growth hormone. *Horm Res* 48 Suppl 5:116-121, 1997
343. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC: Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest* 97:2020-2026, 1996
344. Correia ML, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG: Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension* 37:936-942, 2001
345. Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M: Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest* 100:1107-1113, 1997
346. Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A, Doulgerakis DE, Griveas I, Katsilambros N, Flier JS: Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3408-3413, 1997
347. Trayhurn P, Wood IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347-355, 2004
348. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W: A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 6:1170-1180, 1996
349. Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau SM, Dong J, Kliche KO, Jiang S, Snodgrass HR, Estey EH, Andreeff M: Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 93:1668-1676, 1999
350. Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y: Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 241:765-768, 1997
351. Paolucci M, Buono S, Sciarrillo R, Putti R: Effects of leptin administration on the endocrine pancreas and liver in the lizard *Podarcis sicula*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305:383-395, 2006
352. Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, Guerre-Millo M, Taouis M: Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology* 147:2550-2556, 2006
353. Nakashima K, Narazaki M, Taga T: Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130. *FEBS Lett* 401:49-52, 1997
354. Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K: Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci* 77:1502-1515, 2005
355. Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, Bozza PT: Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283:2203-2210, 2008
356. Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R, Ruzicka K, Bieglmayer C, Endler G, Muellner C, Speiser W, Wagner O: Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res* 90:711-718, 2002

357. Mehebig N, Jaubert AM, Sabourault D, Giudicelli Y, Ribiere C: Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C379-387, 2005
358. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M: Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276:25096-25100, 2001
359. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R: Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13:1231-1238, 1999
360. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS: Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33:95-102, 2001
361. Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M: Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci* 47:141-150, 2001
362. Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ: Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest* 108:1533-1540, 2001
363. Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y: Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 27:4317-4327, 2007
364. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749, 1995
365. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83, 1999
366. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Bang H, Couper D, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Heiss G: Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 53:2473-2478, 2004
367. Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Stefanadis C: Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. *Obes Rev*, 2009
368. Uji Y, Yamamoto H, Tsuchihashi H, Maeda K, Funahashi T, Shimomura I, Shimizu T, Endo Y, Tani T: Adiponectin deficiency is associated with severe polymicrobial sepsis, high inflammatory cytokine levels, and high mortality. *Surgery* 145:550-557, 2009
369. Son BK, Akishita M, Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, Ouchi Y: Adiponectin antagonizes stimulatory effect of tumor necrosis factor-alpha on vascular smooth muscle cell calcification: regulation of growth arrest-specific gene 6-mediated survival pathway by adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Endocrinology* 149:1646-1653, 2008
370. Hajer GR, van Haefen TW, Visseren FL: Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29:2959-2971, 2008

371. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106:2767-2770, 2002
372. Wang Y, Lam KS, Xu JY, Lu G, Xu LY, Cooper GJ, Xu A: Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem* 280:18341-18347, 2005
373. Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, Winder WW: Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol* 92:2475-2482, 2002
374. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpenne C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P: Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146:1764-1771, 2005
375. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpenne C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I: TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 20:1528-1530, 2006
376. O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ: Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1492:72-80, 2000
377. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF: Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 74:34-41, 2000
378. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P: Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8:437-445, 2008
379. Guo L, Li Q, Wang W, Yu P, Pan H, Li P, Sun Y, Zhang J: Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B. *Endocr Res* 34:142-154, 2009
380. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL: Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353:1-4, 2003
381. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C: Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10464-10469, 2004
382. Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG: Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 74:388-395, 2007
383. Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, Deng A, Eichhorn J, Mahajan R, Agrawal R, Greve J, Robbins R, Patterson AJ, Bernstein D, Quertermous T: The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 65:73-82, 2005
384. Maslowska M, Wang HW, Cianflone K: Novel roles for acylation stimulating protein/C3adesArg: a review of recent in vitro and in vivo evidence. *Vitam Horm* 70:309-332, 2005

385. Koistinen HA, Vidal H, Karonen SL, Dusserre E, Vallier P, Koivisto VA, Ebeling P: Plasma acylation stimulating protein concentration and subcutaneous adipose tissue C3 mRNA expression in nondiabetic and type 2 diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1034-1039, 2001
386. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59:63-88, 1997
387. Chiellini C, Costa M, Novelli SE, Amri EZ, Benzi L, Bertacca A, Cohen P, Del Prato S, Friedman JM, Maffei M: Identification of cathepsin K as a novel marker of adiposity in white adipose tissue. *J Cell Physiol* 195:309-321, 2003
388. Taleb S, Canello R, Clement K, Lacasa D: Cathepsin s promotes human preadipocyte differentiation: possible involvement of fibronectin degradation. *Endocrinology* 147:4950-4959, 2006
389. Han J, Luo T, Gu Y, Li G, Jia W, Luo M: Cathepsin K regulates adipocyte differentiation: possible involvement of type I collagen degradation. *Endocr J* 56:55-63, 2009
390. Yang M, Zhang Y, Pan J, Sun J, Liu J, Libby P, Sukhova GK, Doria A, Katunuma N, Peroni OD, Guerre-Millo M, Kahn BB, Clement K, Shi GP: Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat Cell Biol* 9:970-977, 2007
391. Taleb S, Lacasa D, Bastard JP, Poitou C, Canello R, Pelloux V, Viguerie N, Benis A, Zucker JD, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Langin D, Clement K: Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *FASEB J* 19:1540-1542, 2005
392. Wiesner G, Morash BA, Ur E, Wilkinson M: Food restriction regulates adipose-specific cytokines in pituitary gland but not in hypothalamus. *J Endocrinol* 180:R1-6, 2004
393. Dutton S, Trayhurn P: Regulation of angiopoietin-like protein 4/fasting-induced adipose factor (Angptl4/FIAF) expression in mouse white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Br J Nutr* 100:18-26, 2008
394. Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, Kleemann R, Bakker A, Veenman F, Wahli W, Muller M, Kersten S: The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J Biol Chem* 279:34411-34420, 2004
395. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W: Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem* 275:28488-28493, 2000
396. Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RL, Xu JY, Chen B, Chow WS, Tso AW, Lam KS: Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6086-6091, 2005
397. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW: Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E1253-1261, 2006
398. de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, Ndubuizu K, Patil S, Schwartz A, Kligman M, Fried SK, Gong DW, Shuldiner AR, Pollin TI,

- McLenithan JC: Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 56:1655-1661, 2007
399. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362, 2005
400. Ost A, Danielsson A, Liden M, Eriksson U, Nystrom FH, Stralfors P: Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *FASEB J* 21:3696-3704, 2007
401. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312, 2001
402. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111:225-230, 2003
403. Adeghate E: An update on the biology and physiology of resistin. *Cell Mol Life Sci* 61:2485-2496, 2004
404. Hotamisligil GS: The irresistible biology of resistin. *J Clin Invest* 111:173-174, 2003
405. Nagaev I, Smith U: Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285:561-564, 2001
406. Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd Hiler M: Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300:674-678, 2003
407. Utzschneider KM, Carr DB, Tong J, Wallace TM, Hull RL, Zraika S, Xiao Q, Mistry JS, Retzlaff BM, Knopp RH, Kahn SE: Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia* 48:2330-2333, 2005
408. Li Q, Chen R, Moriya J, Yamakawa J, Sumino H, Kanda T, Takahashi T: A novel adipocytokine, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin), and obesity. *J Int Med Res* 36:625-629, 2008
409. Youn BS, Kloting N, Kratzsch J, Lee N, Park JW, Song ES, Ruschke K, Oberbach A, Fasshauer M, Stumvoll M, Bluher M: Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 57:372-377, 2008
410. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I: Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307:426-430, 2005
411. Kloting N, Kloting I: Visfatin: gene expression in isolated adipocytes and sequence analysis in obese WOKW rats compared with lean control rats. *Biochem Biophys Res Commun* 332:1070-1072, 2005
412. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC: Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98:2088-2093, 1998
413. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A: Activation of human aortic

smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393:790-793, 1998

414. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274:32048-32054, 1999

415. Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE: Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* 10:1457-1466, 1996

416. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM: Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 100:1863-1869, 1997

417. Souza SC, Yamamoto MT, Franciosa MD, Lien P, Greenberg AS: BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor-alpha: a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* 47:691-695, 1998

418. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82, 1998

419. Murao K, Imachi H, Momoi A, Sayo Y, Hosokawa H, Sato M, Ishida T, Takahara J: Thiazolidinedione inhibits the production of monocyte chemoattractant protein-1 in cytokine-treated human vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 454:27-30, 1999

420. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85:394-402, 1999

421. Kuusisto J, Andrulionyte L, Laakso M: Atherosclerosis and cardiovascular risk reduction with PPAR agonists. *Curr Atheroscler Rep* 9:274-280, 2007

422. Pineda Torra I, Gervois P, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol* 10:151-159, 1999

423. Francis GA, Annicotte JS, Auwerx J: PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 3:186-191, 2003

424. Spencer CM, Markham A: Troglitazone. *Drugs* 54:89-101; discussion 102, 1997

425. Ginsberg H, Plutzky J, Sobel BE: A review of metabolic and cardiovascular effects of oral antidiabetic agents: beyond glucose-level lowering. *J Cardiovasc Risk* 6:337-346, 1999

426. Kintscher U, Law RE: PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E287-291, 2005

427. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:22435-22441, 2000

428. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82-86, 1998

429. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA: Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101:1311-1318, 2000
430. Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:1097-1103, 1998
431. Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL: Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2094-2104, 1999
432. Pond CM: An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 51:367-377, 1992
433. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP: Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 58:463-467, 1993
434. Wells JC: Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:415-430, 2007
435. Taylor RW, Grant AM, Williams SM, Goulding A: Sex Differences in Regional Body Fat Distribution From Pre- to Postpuberty. *Obesity (Silver Spring)*, 2009
436. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS: Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12729-12734, 2000
437. Cooke PS, Heine PA, Taylor JA, Lubahn DB: The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 178:147-154, 2001
438. Ma H, Sprecher HW, Kolattukudy PE: Estrogen-induced production of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand in a PPARgamma-expressing tissue. *J Biol Chem* 273:30131-30138, 1998
439. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S: Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 358:813-818, 2007
440. Kubo M, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1789:71-77, 2009
441. Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y, Grillier-Vuissoz I: Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 112:437-451, 2008
442. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, Krikov M, Bhanot S, Barros R, Morani A, Gustafsson JA, Unger T, Kintscher U: Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet* 4:e1000108, 2008
443. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Melchionda N, Morselli Labate AM, Fabbri R, Capelli M, Bortoluzzi L: Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism* 40:101-104, 1991
444. Gapstur SM, Gann PH, Kopp P, Colangelo L, Longcope C, Liu K: Serum androgen concentrations in young men: a longitudinal analysis of associations with age, obesity,

- and race. The CARDIA male hormone study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1041-1047, 2002
445. Tchernof A, Despres JP: Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 32:526-536, 2000
446. Feher T, Halmy L, Bodrogi L, Kazik MH: Dehydroepiandrosterone concentration in adipose tissue of normal and overweight subjects. *Horm Metab Res* 8:372-374, 1976
447. Boyanov MA, Boneva Z, Christov VG: Testosterone supplementation in men with type 2 diabetes, visceral obesity and partial androgen deficiency. *Aging Male* 6:1-7, 2003
448. Blouin K, Veilleux A, Luu-The V, Tchernof A: Androgen metabolism in adipose tissue: recent advances. *Mol Cell Endocrinol* 301:97-103, 2009
449. Elbers JM, Grootenhuys AJ: New tissue-selective androgens: perspectives in the treatment of androgen deficits. *Ann Endocrinol (Paris)* 64:183-188, 2003
450. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S: Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 144:5081-5088, 2003
451. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S: Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology* 147:141-154, 2006
452. Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S: The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5045-5051, 2001
453. Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y: Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology* 141:649-656, 2000
454. Monjo M, Pujol E, Roca P: alpha2- to beta3-Adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17beta-estradiol, and progesterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E145-150, 2005
455. Giri S, Rattan R, Haq E, Khan M, Yasmin R, Won JS, Key L, Singh AK, Singh I: AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr Metab (Lond)* 3:31, 2006
456. Gizard F, Bruemmer D: Transcriptional Control of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma: Therapeutic Implications for Cardiovascular Diseases. *PPAR Res* 2008:429123, 2008
457. Takano H, Komuro I: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J* 73:214-220, 2009
458. Park Y, Freedman BD, Lee EJ, Park S, Jameson JL: A dominant negative PPARgamma mutant shows altered cofactor recruitment and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Diabetologia* 46:365-377, 2003
459. Gurnell M, Wentworth JM, Agostini M, Adams M, Collingwood TN, Provenzano C, Browne PO, Rajanayagam O, Burris TP, Schwabe JW, Lazar MA, Chatterjee VK: A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)

- mutant is a constitutive repressor and inhibits PPAR γ -mediated adipogenesis. *J Biol Chem* 275:5754-5759, 2000
460. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR: Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 241:270-274, 1997
461. Masugi J, Tamori Y, Mori H, Koike T, Kasuga M: Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 268:178-182, 2000
462. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J: A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-287, 1998
463. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES: The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80, 2000
464. Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, Zee RY: Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:859-863, 2003
465. Iwata E, Yamamoto I, Motomura T, Tsubakimori S, Nohnen S, Ohmoto M, Igarashi T, Azuma J: The association of Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2 with lower carotid artery IMT in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 62:55-59, 2003
466. Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P: Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:195-199, 2000
467. Goriya Y, Kawamori R, Shichiri M, Kikuchi M, Yamasaki Y, Shigeta Y, Abe H: Validation of I.V. small-dose insulin infusion therapy in diabetic ketoacidosis of depancreatized dogs. *Acta Diabetol Lat* 15:236-242, 1978
468. Engerman RL, Kern TS: Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes* 36:808-812, 1987
469. Marliss EB, Nakhoda AF, Poussier P, Sima AA: The diabetic syndrome of the 'BB' Wistar rat: possible relevance to type 1 (insulin-dependent) diabetes in man. *Diabetologia* 22:225-232, 1982
470. Ikehara S, Ohtsuki H, Good RA, Asamoto H, Nakamura T, Sekita K, Muso E, Tochino Y, Ida T, Kuzuya H, et al.: Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by allogenic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7743-7747, 1985
471. Mendez JD, Ramos HG: Animal models in diabetes research. *Arch Med Res* 25:367-375, 1994
472. Srinivasan K, Ramarao P: Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125:451-472, 2007

473. Stender S, Dyerberg J, Astrup A: High levels of industrially produced trans fat in popular fast foods. *N Engl J Med* 354:1650-1652, 2006
474. Bogin B: From caveman cuisine to fast food: the evolution of human nutrition. *Growth Horm IGF Res* 8 Suppl B:79-86, 1998
475. Krebs JR: The gourmet ape: evolution and human food preferences. *Am J Clin Nutr* 90:707S-711S, 2009
476. Shin A, Lim SY, Sung J, Shin HR, Kim J: Dietary intake, eating habits, and metabolic syndrome in Korean men. *J Am Diet Assoc* 109:633-640, 2009
477. D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/homology/maps/>
478. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, Tome D, Jais JP, Junien C: C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 15:1996-2005, 2007
479. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC: Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14:741-751, 2008
480. Barandier C, Montani JP, Yang Z: Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1807-1813, 2005
481. Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K: A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 321:967-974, 2004
482. Maurin AC, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, Serre CM, Meunier PJ: Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26:485-489, 2000
483. Bjorntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjostrom L, Smith U: Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 19:316-324, 1978
484. Vina J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV: Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett* 579:2541-2545, 2005
485. Bastard JP, Pieroni L: Plasma plasminogen activator inhibitor 1, insulin resistance and android obesity. *Biomed Pharmacother* 53:455-461, 1999
486. Rebolledo OR, Marra CA, Raschia A, Rodriguez S, Gagliardino JJ: Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet. *Horm Metab Res* 40:794-800, 2008
487. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH: Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 154:899-906, 2006
488. Kley HK, Solbach HG, McKinnan JC, Kruskemper HL: Testosterone decrease and oestrogen increase in male patients with obesity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 91:553-563, 1979
489. Kley HK, Deselaers T, Peerenboom H: Evidence for hypogonadism in massively obese males due to decreased free testosterone. *Horm Metab Res* 13:639-641, 1981
490. Polderman KH, Gooren LJ, Asscheman H, Bakker A, Heine RJ: Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 79:265-271, 1994
491. Cooke PS, Naaz A: Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:1127-1135, 2004

492. Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, Martini C, Marino M: Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infect Disord Drug Targets* 8:52-60, 2008
493. Tchernof A, Poehlman ET: Weight gain and menopause. *Menopause* 7:419-421, 2000
494. Geisler JG, Zawalich W, Zawalich K, Lakey JR, Stukenbrok H, Milici AJ, Soeller WC: Estrogen can prevent or reverse obesity and diabetes in mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 51:2158-2169, 2002
495. Masding MG, Stears AJ, Burdge GC, Wootton SA, Sandeman DD: The benefits of oestrogens on postprandial lipid metabolism are lost in post-menopausal women with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 23:768-774, 2006
496. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P: Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150:2109-2117, 2009
497. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, Cauley JA, Barrett-Connor E: Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 138:1-9, 2003
498. Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, Bassford T, Burke G, Torrens J, Howard BV: Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 47:1175-1187, 2004
499. Jackson SL, Scholes D, Boyko EJ, Abraham L, Fihn SD: Urinary incontinence and diabetes in postmenopausal women. *Diabetes Care* 28:1730-1738, 2005
500. Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, Dahlman-Wright K, Nilsson S, Gustafsson JA, Efendic S, Khan A: Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 49:588-597, 2006
501. Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A, Efendic S, Dahlman-Wright K: Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E904-912, 2008
502. Nilsson M, Dahlman I, Ryden M, Nordstrom EA, Gustafsson JA, Arner P, Dahlman-Wright K: Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *Int J Obes (Lond)* 31:900-907, 2007
503. Klein KO, Larmore KA, de Lancey E, Brown JM, Considine RV, Hassink SG: Effect of obesity on estradiol level, and its relationship to leptin, bone maturation, and bone mineral density in children. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3469-3475, 1998
504. Urbancsek J, Fedorcsak P, Klinga K, Devenyi N, Papp Z, Rabe T, Strowitzki T: Impact of obesity and leptin levels on the secretion of estradiol, inhibin A and inhibin B during ovarian stimulation with gonadotropins. *Gynecol Endocrinol* 16:285-292, 2002
505. Schatz F, Hochberg RB: Lipoidal derivative of estradiol: the biosynthesis of a nonpolar estrogen metabolite. *Endocrinology* 109:697-703, 1981
506. Kanji SS, Kuohung W, Labaree DC, Hochberg RB: Regiospecific esterification of estrogens by lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2481-2488, 1999

507. Tagawa N, Yuda R, Kubota S, Wakabayashi M, Yamaguchi Y, Kiyonaga D, Mori N, Minamitani E, Masuzaki H, Kobayashi Y: 17 β -Estradiol inhibits 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in rodent adipocytes. *J Endocrinol*, 2009
508. Godsland IF: The influence of female sex steroids on glucose metabolism and insulin action. *J Intern Med Suppl* 738:1-60, 1996
509. Houssay BA, Foglia VG, Rodriguez RR: Production or prevention of some types of experimental diabetes by oestrogens or corticosteroids. *Acta Endocrinol (Copenh)* 17:146-164, 1954
510. Foglia VG, Rodriguez RR: [Mechanism of the sex difference in diabetes.]. *An Fac Med Univ Repub Montev Urug* 35:785-795, 1950
511. Lewis JT, Foglia VG, Rodriguez RR: The effects of steroids on the incidence of diabetes in rats after subtotal pancreatectomy. *Endocrinology* 46:111-121, 1950
512. Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, Shima K: Sexual difference in the incidence of diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty rats: effects of castration and sex hormone replacement on its incidence. *Metabolism* 43:1214-1220, 1994
513. Keller H, Givel F, Perroud M, Wahli W: Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 9:794-804, 1995
514. Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG: Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* 14:3741-3751, 1995
515. Manco M, Calvani M, Mingrone G: Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab* 6:402-413, 2004
516. Harding AH, Day NE, Khaw KT, Bingham S, Luben R, Welsh A, Wareham NJ: Dietary fat and the risk of clinical type 2 diabetes: the European prospective investigation of Cancer-Norfolk study. *Am J Epidemiol* 159:73-82, 2004
517. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 23:447-456, 2004
518. Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noe V, Ciudad CJ, Mace K, Gomez-Foix AM: DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E229-237, 2001
519. Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, Cho IH, Pyo JH, Kim CK, Sinclair AJ, Febbraio MA, Watt MJ: Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* 100:1467-1474, 2006
520. Stein O, Dabach Y, Ben-Naim M, Halperin G, Stein Y: Effects of oleic acid and macrophage recruitment on cholesterol efflux in cell culture and in vivo. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:596-601, 2008
521. Titov VN: [Oleic fatty acid, Oleic, linoleic, linolenic low-density lipoproteins]. *Klin Lab Diagn*:3-13, 2006
522. Cicero AF, Nascetti S, Lopez-Sabater MC, Elosua R, Salonen JT, Nyssonen K, Poulsen HE, Zunft HJ, Kiesewetter H, de la Torre K, Covas MI, Kaikkonen J, Mursu J, Koenbick C, Baumler H, Gaddi AV: Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *J Am Coll Nutr* 27:314-320, 2008

523. Tardy AL, Giraudet C, Rousset P, Rigaudiere JP, Laillet B, Chalancon S, Salles J, Loreau O, Chardigny JM, Morio B: Effects of trans MUFA from dairy and industrial sources on muscle mitochondrial function and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 49:1445-1455, 2008
524. Edvardsson U, Ljungberg A, Oscarsson J: Insulin and oleic acid increase PPARgamma2 expression in cultured mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 340:111-117, 2006
525. Soriguer F, Esteve I, Rojo-Martinez G, Ruiz de Adana MS, Dobarganes MC, Garcia-Almeida JM, Tinahones F, Beltran M, Gonzalez-Romero S, Oliveira G, Gomez-Zumaquero JM: Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur J Endocrinol* 150:33-39, 2004
526. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH: Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis* 8:25, 2009
527. Basciano H, Miller AE, Naples M, Baker C, Kohen R, Xu E, Su Q, Allister E, Wheeler M, Adeli K: Metabolic Effects of Dietary Cholesterol in an Animal Model of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009
528. Schaffer JE: Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14:281-287, 2003
529. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB: Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav* 94:231-241, 2008
530. Coleman R, Bell RM: Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols. *J Biol Chem* 251:4537-4543, 1976
531. Albi E, Cataldi S, Rossi G, Viola Magni M, Toller M, Casani S, Perrella G: The nuclear ceramide/diacylglycerol balance depends on the physiological state of thyroid cells and changes during UV-C radiation-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 478:52-58, 2008
532. Wright MM, McMaster CR: Phospholipid synthesis, diacylglycerol compartmentation, and apoptosis. *Biol Res* 35:223-229, 2002
533. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM: A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1758:2027-2036, 2006
534. Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, Jou W, Pack S, Asghar Z, Wheeler MB, LeRoith D: Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. *Endocrinology* 146:4024-4035, 2005
535. Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH: Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem* 276:5629-5635, 2001
536. Unger RH: Hyperleptinemia: protecting the heart from lipid overload. *Hypertension* 45:1031-1034, 2005
537. Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoka R, Morley JE: Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53:1253-1260, 2004

538. Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ: Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E187-192, 2002
539. Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C, Djiane J, Tome D, Taouis M: In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 242:59-66, 2005
540. Seufert J: Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 53 Suppl 1:S152-158, 2004
541. Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF: Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 84:670-676, 1999
542. Barros R, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson JA: Participation of ER α and ER β in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009
543. Summers SA: Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45:42-72, 2006
544. Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F: Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E211-224, 2009
545. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR: White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39:715-728, 2008
546. Junkin KA, Dyck DJ, Mullen KL, Chabowski A, Thrush AB: Resistin acutely impairs insulin-stimulated glucose transport in rodent muscle in the presence, but not absence, of palmitate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R944-951, 2009
547. Schlame M, Rua D, Greenberg ML: The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39:257-288, 2000
548. Schlame M, Towbin JA, Heerdt PM, Jehle R, DiMauro S, Blanck TJ: Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Ann Neurol* 51:634-637, 2002
549. Han X, Yang J, Yang K, Zhao Z, Abendschein DR, Gross RW: Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: a shotgun lipidomics study. *Biochemistry* 46:6417-6428, 2007
550. McGee CD, Lieberman P, Greenwood CE: Dietary fatty acid composition induces comparable changes in cardiolipin fatty acid profile of heart and brain mitochondria. *Lipids* 31:611-616, 1996
551. Cao SG, Hatch GM: Stimulation of phosphatidylglycerolphosphate phosphatase activity by unsaturated fatty acids in rat heart. *Lipids* 29:475-480, 1994
552. Hatch GM: Regulation of cardiolipin biosynthesis in the heart. *Mol Cell Biochem* 159:139-148, 1996
553. Nakagawa Y: Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* 1011:177-184, 2004
554. Orrenius S, Zhivotovsky B: Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol* 1:188-189, 2005
555. McMillin JB, Dowhan W: Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:97-107, 2002

556. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W: Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276:38061-38067, 2001
557. Sander GE, Wilklow FE, Giles TD: Heart failure in diabetes mellitus: causal and treatment considerations. *Minerva Cardioangiol* 52:491-503, 2004
558. Feuvray D: Diabetic cardiomyopathy. *Arch Mal Coeur Vaiss* 97:261-265, 2004
559. Zhao T, Hou M, Xia M, Wang Q, Zhu H, Xiao Y, Tang Z, Ma J, Ling W: Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor-alpha expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cell Immunol* 238:19-30, 2005
560. Warne JP: Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol* 177:351-355, 2003
561. Hammarstedt A, Isakson P, Gustafson B, Smith U: Wnt-signaling is maintained and adipogenesis inhibited by TNFalpha but not MCP-1 and resistin. *Biochem Biophys Res Commun* 357:700-706, 2007
562. Tang CH, Lu DY, Yang RS, Tsai HY, Kao MC, Fu WM, Chen YF: Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 pathway in microglia. *J Immunol* 179:1292-1302, 2007
563. Kim JH, Bachmann RA, Chen J: Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm* 80:613-633, 2009
564. Kloting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M, Kahn BB: Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6:79-87, 2007
565. Thirunavukkarasu C, Meenakshi S, Rajamanickam C: Effect of cytosol on mitochondrial protein synthesis in vitro during cardiac hypertrophy. *Arch Biochem Biophys* 218:163-168, 1982
566. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L: Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44:129-146, 2001
567. Rosen P, Du X, Tschope D: Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? *Mol Cell Biochem* 188:103-111, 1998
568. Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liaudet L, Szabo C: Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res* 89:684-691, 2001
569. Szczepaniak LS, Victor RG, Orci L, Unger RH: Forgotten but not gone: the rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America. *Circ Res* 101:759-767, 2007
570. Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG: Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34:25-33, 1997
571. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH: Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180:53-57, 1998
572. Ruano M, Silvestre V, Castro R, Garcia-Lescun MC, Rodriguez A, Marco A, Garcia-Blanch G: Morbid obesity, hypertensive disease and the renin-angiotensin-aldosterone axis. *Obes Surg* 15:670-676, 2005

573. Mulvihill ER, Jaeger J, Sengupta R, Ruzzo WL, Reimer C, Lukito S, Schwartz SM: Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1283-1289, 2004
574. Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, Hindkjaer J, Kassem M, Falk E: Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2696-2702, 2006
575. Lim HJ, Lee S, Lee KS, Park JH, Jang Y, Lee EJ, Park HY: PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80:165-174, 2006
576. Trayhurn P, Bing C, Wood IS: Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 136:1935S-1939S, 2006
577. Brown JD, Plutzky J: Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation* 115:518-533, 2007
578. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al.: PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609, 1999
579. Herberg L, Doppen W, Major E, Gries FA: Dietary-induced hypertrophic--hyperplastic obesity in mice. *J Lipid Res* 15:580-585, 1974
580. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866, 2002
581. Bullo M, Salas-Salvado J, Garcia-Lorda P: Adiponectin expression and adipose tissue lipolytic activity in lean and obese women. *Obes Surg* 15:382-386, 2005
582. Fan YY, Ramos KS, Chapkin RS: Dietary gamma-linolenic acid suppresses aortic smooth muscle cell proliferation and modifies atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr* 131:1675-1681, 2001
583. Yun MR, Lee JY, Park HS, Heo HJ, Park JY, Bae SS, Hong KW, Sung SM, Kim CD: Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Pharmacol Res* 54:97-102, 2006
584. Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P: Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* 67:1567-1579
585. Soldatos G, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA: Advanced-glycation end products in insulin-resistant states. *Curr Hypertens Rep* 7:96-102, 2005
586. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y: Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract* 76:236-244, 2007
587. Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM: Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J* 18:146-148, 2004

588. Chen Y, Capron L, Magnusson JO, Wallby LA, Arnqvist HJ: Insulin-like growth factor-1 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in rat aorta in vivo. *Growth Horm IGF Res* 8:299-303, 1998
589. Motobayashi Y, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Orino S, Yamaguchi K, Kawazoe K, Hamano S, Tsuchiya K, Tomita S, Tamaki T: Adiponectin inhibits insulin-like growth factor-1-induced cell migration by the suppression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, but not Akt in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 32:188-193, 2009
590. Bell JA, Reed MA, Consitt LA, Martin OJ, Haynie KR, Hulver MW, Muoio DM, Dohm GL: Lipid Partitioning, Incomplete Fatty Acid Oxidation, and Insulin Signal Transduction in Primary Human Muscle Cells: Effects of Severe Obesity, Fatty Acid Incubation, and Fatty Acid Translocase/CD36 Overexpression. *J Clin Endocrinol Metab*
591. Koonen DP, Sung MM, Kao CK, Dolinsky VW, Koves TR, Ilkayeva O, Jacobs RL, Vance DE, Light PE, Muoio DM, Febbraio M, Dyck JR: Alterations in Skeletal Muscle Fatty Acid Handling Predisposes Middle-aged Mice to Diet-induced Insulin Resistance. *Diabetes*
592. Ibrahim A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA: Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 274:26761-26766, 1999
593. Vallve JC, Uliaque K, Girona J, Cabre A, Ribalta J, Heras M, Masana L: Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages. *Atherosclerosis* 164:45-56, 2002
594. Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H: CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett* 537:85-90, 2003
595. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H: CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci* 947:350-355, 2001
596. Vital P, Larrieta E, Hiriart M: Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol* 190:425-432, 2006
597. Heron-Milhavet L, Haluzik M, Yakar S, Gavrilova O, Pack S, Jou WC, Ibrahim A, Kim H, Hunt D, Yau D, Asghar Z, Joseph J, Wheeler MB, Abumrad NA, LeRoith D: Muscle-specific overexpression of CD36 reverses the insulin resistance and diabetes of MKR mice. *Endocrinology* 145:4667-4676, 2004
598. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET: Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation* 110:3335-3340, 2004
599. Mick GJ, Wang X, McCormick K: White adipocyte vascular endothelial growth factor: regulation by insulin. *Endocrinology* 143:948-953, 2002
600. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int* 69:1377-1384, 2006
601. Muise ES, Azzolina B, Kuo DW, El-Sherbeini M, Tan Y, Yuan X, Mu J, Thompson JR, Berger JP, Wong KK: Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by

- peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* 74:403-412, 2008
602. Muraki K, Okuya S, Tanizawa Y: Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J* 53:841-851, 2006
603. Dey D, Mukherjee M, Basu D, Datta M, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S: Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. *Cell Physiol Biochem* 16:217-228, 2005
604. Wasim H, Al-Daghri NM, Chetty R, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S: Relationship of serum adiponectin and resistin to glucose intolerance and fat topography in South-Asians. *Cardiovasc Diabetol* 5:10, 2006
605. Hsueh WA, Jackson S, Law RE: Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 24:392-397, 2001
606. Meredith D, Panchatcharam M, Miriyala S, Tsai YS, Morris AJ, Maeda N, Stouffer GA, Smyth SS: Dominant-negative loss of PPARgamma function enhances smooth muscle cell proliferation, migration, and vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:465-471, 2009
607. van Oort MM, van Doorn JM, Bonen A, Glatz JF, van der Horst DJ, Rodenburg KW, Luiken JJ: Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochim Biophys Acta* 1781:61-71, 2008
608. Xu W, Yu L, Zhou W, Luo M: Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 351:376-382, 2006
609. Lee TS, Lin CY, Tsai JY, Wu YL, Su KH, Lu KY, Hsiao SH, Pan CC, Kou YR, Hsu YP, Ho LT: Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life Sci* 84:97-104, 2009
610. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057-1063, 2001
611. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ: Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 139:551-558, 1998
612. Wellhoener P, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Dantz D, Kerner W, Born J, Fehm HL, Peters A: Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1267-1271, 2000
613. McTernan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, McTernan CL, Clark PM, Smith SA, Barnett AH, Kumar S: Resistin and type 2 diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:6098-6106, 2003

614. Di Simone N, Di Nicuolo F, Marzioni D, Castellucci M, Sanguinetti M, D'Lppolito S, Caruso A: Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. *J Cell Mol Med* 13:388-397, 2009
615. Ukkola O: Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur J Endocrinol* 147:571-574, 2002