

Université de Montréal

**Régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique dans  
l'hypercholestérolémie familiale et le diabète de type 2.**

par

Marie-Claude Beauchamp

Département de nutrition

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Nutrition

Mai 2004



© Marie-Claude Beauchamp, 2004

QU

145

U58

2004

V. 016

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique dans l'hypercholestérolémie familiale  
et le diabète de type 2.

présentée par :  
Marie-Claude Beauchamp

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jane Montgomery, président-rapporteur  
Geneviève Renier, directeur de recherche  
Eugenio Rasio, membre du jury  
Pierre Julien, examinateur externe  
Jean-Louis Chiasson, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux. Les maladies cardiovasculaires sont aussi la principale cause de morbidité et de mortalité chez les sujets hypercholestérolémiques et diabétiques de type 2. La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme clé du métabolisme des lipides et est responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras. Il a été démontré que la LPL est sécrétée par les macrophages (Mo) dans les lésions athéromateuses et que la production de LPL dans la paroi artérielle favorise la formation des cellules spumeuses et l'athérosclérose in vivo.

Au vu du rôle crucial joué par la LPL Mo dans l'athérosclérose, nous avons évalué la régulation de cette enzyme dans deux conditions pathophysiologiques associées à une athérogénèse accélérée, incluant l'hypercholestérolémie familiale (HF) et le diabète de type 2. Nous avons démontré que des Mo dérivés de monocytes de sujets HF incubés dans leur propre sérum surexprimaient la LPL. Une corrélation positive a été observée entre les niveaux de masse et d'activité de la LPL et les niveaux sériques du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-BB). Toutefois, ni l'immunoneutralisation du sérum HF ni l'incubation des Mo HF dans du sérum contrôle n'ont inhibé l'induction de la production de la LPL par les Mo HF. Nous avons aussi documenté que l'incubation de Mo isolés de sujets sains en présence de sérum HF induisait une augmentation de la production de la LPL par ces cellules. Cet effet était aboli par l'immunoneutralisation du PDGF-BB dans le sérum HF, suggérant un rôle stimulant du PDGF-BB sur la LPL Mo. Ces résultats

suggèrent que l'induction de la LPL Mo chez les patients HF puisse être reliée à l'athérogénèse accélérée observée chez ces sujets.

Nous avons préalablement démontré que l'expression de la LPL Mo est augmentée chez les patients diabétiques de type 2 et que des facteurs métaboliques, tels le glucose et les acides gras, semblaient responsables de cet effet. En nous basant sur ces données, nous avons vérifié l'effet direct de deux autres facteurs élevés dans le diabète, incluant l'homocystéine (hcys) et les produits terminaux de glycation (AGEs), sur l'expression de la LPL Mo in vitro.

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires et cette relation est encore plus forte dans le diabète. Nous avons montré que l'hcys induisait l'expression génique et protéique de la LPL Mo in vitro et que cet effet était médié par la protéine kinase C (PKC). L'hcys stimulait aussi les niveaux d'ARNm de c-fos et la liaison des protéines nucléaires à la séquence AP-1 présente dans le promoteur du gène de la LPL. Ces données proposent un nouveau mécanisme par lequel l'hcys exerce ses effets pro-athérogéniques dans le diabète.

Finalement, nous avons testé l'effet des AGEs sur l'expression de la LPL Mo in vitro. Les AGEs sont des protéines glyquées s'accumulant dans le plasma et les tissus des sujets diabétiques et contribuant à l'athérogénèse. Nous avons démontré que les AGEs potentialisaient l'effet stimulant du glucose sur l'expression génique et protéique de la LPL Mo humaine et murine. Cet effet était dépendant de la liaison des AGEs à leur récepteur (RAGE), et impliquait le stress oxydatif et l'activation de la PKC et des protéines kinases

mitogéniques activées (MAPK). Cette étude suggère un nouveau mécanisme par lequel les AGEs participent à l'athérogénèse dans le diabète.

Dans l'ensemble, nos études ont démontré que l'expression de la LPL Mo est augmentée, par divers mécanismes moléculaires, dans des conditions pathophysiologiques incluant l'hypercholestérolémie, l'hyperhomocystéinémie et le diabète de type 2. Ces données suggèrent que cette enzyme puisse contribuer à l'athérogénèse accélérée associée à ces maladies.

**Mots-clés :** athérosclérose, maladie cardiovasculaire, macrophage, lipoprotéine lipase, hypercholestérolémie familiale, diabète de type 2, homocystéine, produits terminaux de glycation, stress oxydatif, kinases.

## Abstract

Atherosclerosis is the leading cause of death in western countries. Cardiovascular diseases are also the principal cause of morbidity and mortality in hypercholesterolemic patients and in type 2 diabetes. Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipid metabolism and is responsible for the hydrolysis of triglycerides to fatty acids. It has been shown that LPL is secreted by macrophages (Mo) in the atherosclerotic lesions and that LPL production in the arterial wall promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo.

Based on the crucial role of Mo LPL in atherosclerosis, we sought to evaluate the expression of Mo LPL in two pathophysiological conditions associated with accelerated atherogenesis, namely familial hypercholesterolemia (FH) and type 2 diabetes. We found that monocyte-derived Mo isolated from hypercholesterolemic patients cultured in their own serum overexpressed LPL, both at the mRNA and protein levels, compared to control subjects. A positive correlation was observed between LPL mass and activity levels and serum platelet-derived growth factor (PDGF-BB) levels. However, neither PDGF-BB immunoneutralization of the FH serum nor incubation of FH Mo with control serum reversed the induction of LPL secretion by these cells. Interestingly, incubation of Mo isolated from healthy donors with FH serum caused an increment of LPL production by these cells. This effect was totally abolished by PDGF-BB immunoneutralization of the FH serum, implying a role for PDGF-BB as a Mo LPL stimulatory molecule. These findings suggest that Mo LPL induction in patients with FH might be related to the increased atherogenesis observed in these subjects.

Based on previous studies showing that Mo LPL expression is increased in patients with type 2 diabetes and that metabolic factors dysregulated in this disease, such as glucose and fatty acids, increased Mo LPL expression, we assessed the direct effect of two other factors augmented in diabetes, including homocysteine (hcys) and advanced glycation end-products (AGEs), on Mo LPL expression in vitro.

Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular disease. This association seems even stronger in human diabetes. We found that hcys induced Mo LPL at the gene and protein levels in vitro. We demonstrated that this stimulatory effect was protein kinase C (PKC)-dependent. Hcys also increased c-fos mRNA levels and enhanced the nuclear protein binding to the AP-1 sequence of the LPL gene promoter. These observations propose a new mechanism by which hcys may exert its pro-atherogenic effects in human diabetes.

Finally, we assessed the effect of AGEs on Mo LPL expression in vitro. AGEs are glycosylated proteins that accumulate in the plasma and tissue of diabetic subjects and exert pro-atherogenic effects. We found that AGE potentiated the stimulatory effect of glucose on the gene and protein expression of LPL in human and murine Mo. This effect was PKC and mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent and implicated reactive oxygen species induced by the binding of AGEs to their specific receptor RAGE. This study provides a new mechanism by which AGEs elicit their pro-atherogenic effects in human diabetes.

Overall, we demonstrated that Mo LPL is overexpressed, by various mechanisms, in pathophysiological conditions such as hypercholesterolemia, hyperhomocysteinemia and type 2 diabetes. These data suggest that this enzyme might contribute to the accelerated atherogenesis associated with these diseases.

**Keywords** : atherosclerosis, cardiovascular diseases, macrophage, lipoprotein lipase, familial hypercholesterolemia, type 2 diabetes, homocysteine, advanced glycation end-products, oxidative stress, kinases.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xix
I. Introduction.....	1
I.1. ATHÉROSCLÉROSE.....	2
I.1.1 Généralités.....	2
I.1.2 La dysfonction endothéliale.....	4
I.1.3 La strie lipidique.....	6
I.1.4 La lésion avancée ou compliquée.....	8
I.1.5 La plaque fibreuse instable.....	9
I.1.6 Facteurs de risques traditionnels.....	11
I.1.6.1 Tabagisme.....	11
I.1.6.2 Hypertension artérielle.....	12
I.1.6.3 Obésité.....	13
I.1.6.4 Dyslipidémies.....	15
I.1.6.4.1 Hypercholestérolémie.....	15
I.1.6.4.2 Hypertriglycéridémie.....	17
I.1.6.4.3 Déficience en HDL.....	19
I.1.6.5 Diabète de type 2.....	20
I.1.7 Facteurs de risque non traditionnels.....	20
I.1.7.1 Facteurs inflammatoires.....	20
I.1.7.1.1 Protéine C-réactive (CRP).....	20
I.1.7.1.2 Lipoprotéine(a).....	23

I.1.7.1.3	Fibrinogène .....	24
I.1.7.2	Facteurs infectieux .....	25
I.1.7.2.1	Chlamydia pneumonia .....	25
I.1.7.2.2	Helicobacter pylori .....	26
I.1.7.3	L'hyperhomocystéinémie.....	27
I.1.7.3.1	L'homocystéine, un intermédiaire du métabolisme de la méthionine	28
I.1.7.3.2	Mécanismes par lequel l'hcys exerce son effet pro-athérogénique ....	30
I.1.7.4	Produits terminaux de glycation (AGEs) .....	33
I.1.7.4.1	Formation des AGEs .....	33
I.1.7.4.2	Effets pro-athérogéniques des AGEs.....	35
I.1.7.4.3	Les récepteurs des AGEs .....	37
I.2.	DIABÈTE DE TYPE 2 .....	40
I.2.1	Définition .....	40
I.2.2	Diagnostic .....	41
I.2.3	Prévalence .....	41
I.2.4	Diabète de type 2 et facteurs de risque.....	42
I.2.5	Complications microvasculaires du diabète de type 2. ....	44
I.2.5.1	La rétinopathie .....	45
I.2.5.2	La néphropathie.....	45
I.2.5.3	La neuropathie.....	46
I.2.6	Complications macrovasculaires du diabète de type 2. ....	46
I.2.7	Obésité, inflammation et IR. ....	48
I.2.8	Obésité, acides gras libres (AGL) et IR .....	51
I.2.9	Dysfonction endothéliale et l'IR dans le diabète de type 2.....	54
I.3.	LIPOPROTÉINE LIPASE.....	58
I.3.1	Synthèse, sécrétion et maturation de l'enzyme .....	58
I.3.2	Organisation du gène de la LPL.....	59
I.3.2.1	Régulation transcriptionnelle de la LPL .....	60
I.3.3	Régulateurs physiologiques de la LPL.....	62
I.3.3.1	L'état de jeûne, l'état post-prandial et l'exercice physique .....	62

I.3.3.2	Régulation hormonale .....	63
I.3.3.2.1	Hormone de croissance.....	63
I.3.3.2.2	Insuline .....	64
I.3.3.2.3	Les glucocorticoïdes .....	65
I.3.3.2.4	Leptine .....	66
I.3.3.2.5	Les hormones sexuelles .....	66
I.3.3.3	Les cytokines pro-inflammatoires.....	67
I.3.3.3.1	TNF $\alpha$ .....	67
I.3.3.3.2	Interleukine-1 (IL-1).....	68
I.3.3.3.3	INF- $\gamma$ .....	68
I.3.3.3.4	IL-6 .....	69
I.3.3.3.5	Lipopolysaccharide (LPS).....	69
I.3.4	LPL et obésité .....	71
I.3.5	LPL et diabète de type 2.....	72
I.3.6	La LPL et l'athérosclérose .....	74
I.3.6.1	Effets anti-athérogéniques de la LPL.....	75
I.3.6.2	Effets pro-athérogéniques de la LPL.....	76
I.3.6.2.1	Mécanismes par lesquels la LPL macrophagique exerce ses effets pro-athérogéniques.....	78
I.4.	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	80
II.	Résultats .....	83
II.1.	Premier article : <i>Macrophage lipoprotein lipase is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia</i> .....	84
II.2.	Deuxième article: <i>Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-fos and lipoprotein lipase expression in macrophages</i> .....	116
II.3.	Troisième article : <i>Advanced glycation end-products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression : involvement of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase</i> .....	150
III.	Discussion .....	186

III.1.Importance de la LPL macrophagique dans le processus athéromateux.....	187
III.2.Régulation de la LPL macrophagique dans l'HF .....	187
III.3.Régulation de la LPL macrophagique par l'homocystéine .....	195
III.4.Régulation de la LPL macrophagique par les AGEs .....	202
IV. Conclusion.....	211
V. Perspectives.....	212
VI. Bibliographie.....	216

## Liste des tableaux

### Introduction :

Tableau I. Mécanismes pathophysiologiques contribuant aux MCV associées au diabète de type 2. ....	48
Tableau II. Éléments de réponse présents dans le promoteur du gène de la LPL.....	62
Tableau III. Régulateurs physiologiques de la LPL (Mead et al., 2002). ....	70

### Premier article:

TABLE 1. Clinical characteristics of patients with FH (n=13).....	100
---	-----

## Liste des figures

### Introduction :

Figure 1. Causes de mortalité au Canada en 1997. ....	2
Figure 2. Stades du développement de l'athérosclérose (Ross R, 1999). ....	3
Figure 3. Métabolisme de l'hcys. ....	29
Figure 4. Formation des AGEs. ....	34
Figure 5. Mécanismes potentiels par lesquels les AGE induisent l'IR dans le muscle. ....	53
Figure 6. L'obésité favorise la progression parallèle de l'IR au diabète de type 2 et de la dysfonction endothéliale à l'athérosclérose (adapté de Lyon CJ et al, 2003). ....	57

### Premier article:

Figure 1. LPL mRNA levels, immunoreactive mass and activity in macrophages of control subjects (ctl) and patients with FH (FH). ....	101
Figure 2. Scatterplots showing the correlations between platelet-poor plasma PDGF-BB levels in FH patients (n=7) and LPL mRNA levels (A), immunoreactive mass (B) and activity (C) from macrophages of FH patients cultured in their own sera. ....	102
Figure 3. LPL immunoreactive mass and activity secreted by macrophages of control subjects (ctl) and patients with FH (FH). ....	103
Figure 4. LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) secreted by control macrophages cultured in PDGF-BB- (50ng/ml) immunoneutralized FH sera. ....	104
Figure 5. Levels of TNF $\alpha$ (A), IL-1 $\beta$ (B), IL-6 (C) and 8- <i>epi</i> -PGF2 $\alpha$ (D) in the supernatants of macrophages of control subjects (ctl) or patients with FH (FH). ....	105

### Deuxième article:

Figure 1. . Effect of Hcys on Mo LPL mRNA levels. ....	130
Figure 2. Dose-dependent effect of Hcys on Mo LPL mRNA levels and immunoreactive mass. ....	131

Figure 3. Effect of Hcys on Mo LPL immunoreactive mass (A) and activity (B).....	132
Figure 4. Effect of calphostin C on Hcys-stimulated Mo LPL mRNA levels (A). Effect of Hcys on PKC activity (B).....	133
Figure 5. Effect of Hcys on Mo c-fos mRNA levels.....	134
Figure 6. Effect of Hcys on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter.....	135

### **Troisième article:**

Figure 1. Effect of AGE on LPL mRNA levels and secretion in J774 macrophages.....	166
Figure 2. Effect of AGE on LPL mRNA levels and secretion in human monocyte-derived macrophages.....	167
Figure 3. Role of AGE receptor on AGE-induced macrophage LPL mRNA expression...	168
Figure 4. Effect of antioxidants on AGE-induced macrophage LPL mRNA expression...	169
Figure 5. Effect of AGE on PKC and MAPK activation in J774 macrophages.....	170
Figure 6. Effect of PKC and ERK 1/2 inhibitors on AGE-induced macrophage LPL mRNA expression.....	171
Figure 7. Effect of AGE on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter.....	172

### **Discussion:**

Figure 1. Mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression de la LPL macrophagique par les AGEs et l'Hcys.....	209
--	-----

## Liste des abréviations

**AGEs** : produits terminaux de glycation  
**AGL** : acides gras libres  
**CML** : cellules musculaires lisses  
**CRP** : protéine C réactive  
**DCCT** : *Diabetes Control and Complications Trial*  
**ELAM-1** : E-sélectine  
**eNOS** : oxyde nitrique synthase endothéliale  
**ERK 1/2** : kinases extracellulaires régulées  
**FGF** : facteur de croissance des fibroblastes  
**GH** : hormone de croissance  
**Hcys** : homocystéine  
**HDL** : lipoprotéines de haute densité  
**HF** : hypercholestérolémie familiale  
**Hhcs** : hyperhomocystéinémie  
**HSPG** : héparan sulfate protéoglycan  
**ICAM-1** : molécule d'adhésion intercellulaire-1  
**IGF-1** : facteur de croissance de l'insuline  
**IL-1** : interleukine-1  
**IL-6** : interleukine-6  
**IM** : infarctus du myocarde  
**IMC** : indice de masse corporelle  
**INF- $\gamma$**  : interféron- $\gamma$   
**IR** : insulino-résistance  
**IRS-1** : substrat du récepteur de l'insuline-1  
**LDL** : lipoprotéines de basse densité  
**LOX-1** : *lectin-like oxidized LDL receptor*  
**Lp(a)** : lipoprotéine (a)  
**LPL** : lipoprotéine lipase  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**MAPK** : protéine kinase mitogénique activée  
**MCP-1** : protéine chémoattractive monocytaire-1  
**M-CSF** : facteur macrophagique stimulant des colonies  
**MCV** : maladie cardiovasculaire  
**MMP** : métalloprotéinase de la matrice  
**NADPH oxydase** : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate oxydase  
**NO** : oxyde nitrique  
**PAI-1** : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1  
**PBMC** : cellules mononucléaires périphériques sanguines  
**PDGF** : facteur de croissance dérivé des plaquettes  
**PI-3-K** : phosphatidylinositol-3-kinase  
**PKC** : protéine kinase C

**PON** : paraoxonase  
**PPAR** : *peroxisome proliferator activated receptor*  
**RAGE** : récepteur des produits terminaux de glycation  
**ROS** : espèces radicalaires oxygénées  
**SR-A** : récepteur scavenger-*A*  
**SR-B1** : récepteur scavenger-B1  
**SRE** : élément de réponse aux stéroïdes  
**TF** : facteur tissulaire  
**TG** : triglycérides  
**TNF $\alpha$**  : facteur de nécrose tumorale  $\alpha$   
**t-PA** : activateur du plasminogène  
**TZD** : thiazolidinedione  
**UKPDS** : *United Kingdom Prospective Diabetes Study*  
**VCAM-1** : molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1  
**VLDL** : lipoprotéine de très basse densité

*À ma famille et mon amour, Martin*

*À ma directrice Geneviève*

## Remerciements

Je tiens à remercier mon amour, Martin, et ma famille pour leur amour et leur support.

Je remercie aussi ma directrice Geneviève qui m'a fait grandir, autant d'un point de vue scientifique qu'au plan humain et que je n'oublierai jamais. Je suis très reconnaissante à tous les membres du laboratoire, passés et présents : Jean-Claude Mamputu, Maryam Radimeh Sartippour, Ling Li, Fritz Maingrette et Sophie-Élise Michaud. Vous avez contribué à faire de mon doctorat des années extrêmement heureuses.

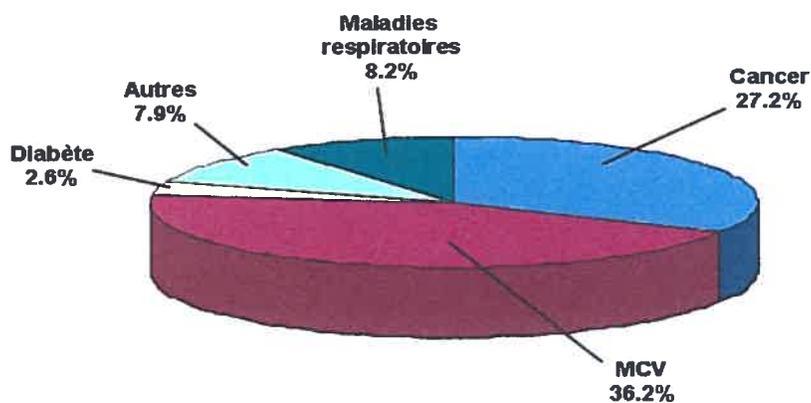
Je termine en remerciant mes grandes amies, mes âmes sœurs, Marie-Lou, Anne et Caroline, qui sont et seront toujours là pour moi. Je vous aime beaucoup.

## **I. Introduction**

## I.1. ATHÉROSCLÉROSE

### I.1.1 Généralités

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux tels que le Canada (voir Figure 1), les États-Unis et l'Europe.



Source: Statistiques Canada, 1997.

Figure 1. Causes de mortalité au Canada en 1997.

L'athérosclérose se définit comme l'occlusion des artères de gros et de moyens calibres. De nos jours, le concept selon lequel l'athérosclérose constitue un processus inflammatoire est largement accepté. Cette notion est en outre supportée par l'incidence accrue de morbidité et de mortalité cardiovasculaire observée dans diverses maladies auto-immunitaires comme l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé (LED) (Hansson, 2001; Ross, 1999). Le processus athéromateux se développe grâce à des interactions entre les lipoprotéines plasmatiques, les cellules vasculaires, incluant les

monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML), et la matrice extracellulaire de la paroi artérielle (Fan et Watanabe, 2003). Les lésions athéromateuses se développent tout au cours de la vie et l'on peut classifier le développement de l'athérosclérose en 4 stades tel qu'illustré à la figure 2.

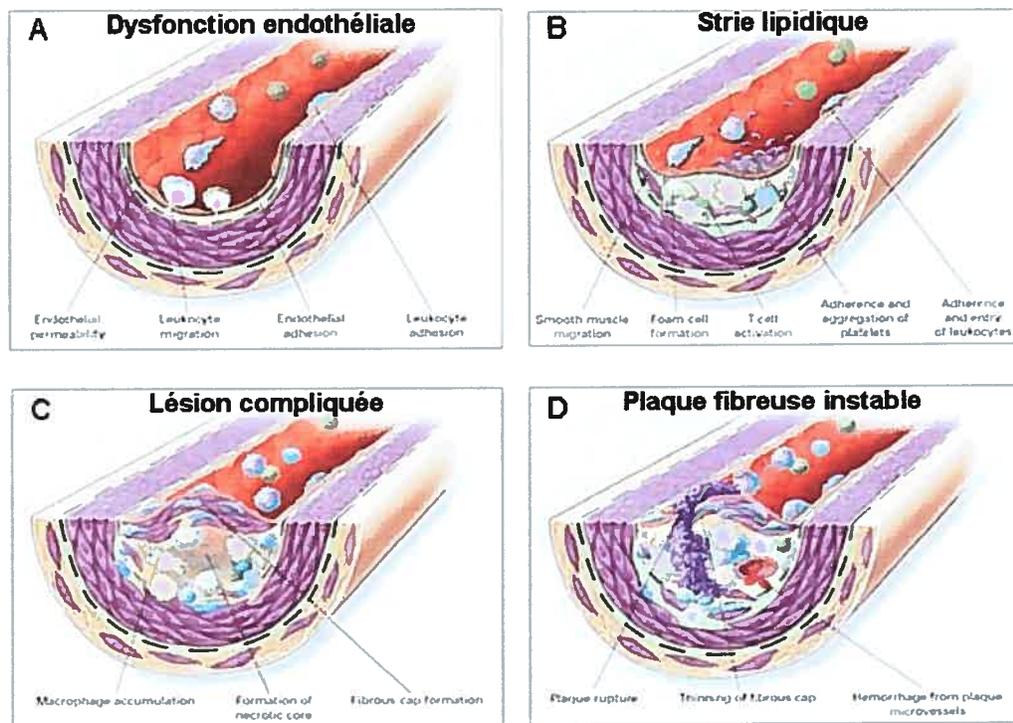


Figure 2. Stades du développement de l'athérosclérose (Ross R, 1999).

### **I.1.2 La dysfonction endothéliale**

L'endothélium vasculaire est un organe paracrine, endocrine et autocrine indispensable au contrôle du tonus vasculaire et au maintien de l'homéostasie vasculaire. La dysfonction endothéliale est définie par une perte de diverses fonctions de l'endothélium se traduisant par une vasoconstriction, une stimulation de la sécrétion de facteurs de croissance, une inflammation et une activité pro-thrombotique (Calles-Escandon et Cipolla, 2001). Dans le contexte des maladies vasculaires, elle décrit habituellement une réduction de sa capacité vasodilatatrice résultant d'une diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) (Biswas, 2003). Outre la détérioration de la vasodilatation endothéliale en réponse à divers stimuli induisant le NO (Calles-Escandon et Cipolla, 2001), une caractéristique communément retrouvée dans la dysfonction endothéliale est l'augmentation de la perméabilité vasculaire, facilitant l'infiltration intimale de macromolécules telles les lipoprotéines de basse densité (LDL), et de cellules inflammatoires. L'état de dysfonction endothéliale s'accompagne aussi d'une activation des cellules endothéliales caractérisée par un milieu pro-inflammatoire, prolifératif et procoagulant favorisant le développement de tous les stades de l'athérosclérose. L'activation endothéliale se traduit par l'expression de diverses molécules d'adhésion incluant la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1), la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) et la E-sélectine (ELAM-1) médiant l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium vasculaire (Beckman et al., 2002a). Une autre fonction primordiale de l'endothélium est le maintien de la fluidité sanguine et de l'intégrité de la paroi vasculaire (Calles-Escandon et Cipolla, 2001). Afin d'assurer cette

fonction, l'endothélium maintient un équilibre entre son activité coagulante et thrombotique. Les plaquettes, les facteurs impliqués dans la voie de la coagulation et de la fibrinolyse sont les acteurs principaux permettant de garder cet équilibre. Ainsi, dans un état de dysfonction endothéliale, il y a une perte de l'activité antithrombotique et anticoagulante. Plusieurs molécules favorisant une activité pro-thrombotique et pro-coagulante sont retrouvées à des niveaux élevés et sont des marqueurs d'un état de dysfonction endothéliale : le facteur von Willebrand, le facteur tissulaire (TF), la thrombomoduline, l'activateur du plasminogène (t-PA) et le plus important, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). Les réactions proinflammatoires, procoagulantes et prothrombotiques décrites plus tôt sont souvent une réponse de l'endothélium à une injure, visant au maintien de l'homéostasie vasculaire. Cette hypothèse de la "réponse à l'injure", d'abord proposée par Ross, est maintenant largement acceptée (Ross, 1999).

La dysfonction endothéliale est un des événements les plus précoces du processus athéromateux et un marqueur précoce de risque cardiovasculaire (figure 2A) (Ross, 1999). Plusieurs études cliniques ont rapporté une association positive entre l'état de dysfonction endothéliale et plusieurs facteurs de risque bien documentés des MCV tels l'hypercholestérolémie, la diminution des lipoprotéines de haute densité (HDL), le tabagisme, l'hypertension, l'hyperhomocystéinémie et le diabète (Hsueh et Quinones, 2003). La dysfonction endothéliale constitue en elle-même un facteur de risque des MCV (Gonzalez et Selwyn, 2003). Diverses études cliniques appuient la notion que l'état de dysfonction endothéliale est un facteur de prédiction des MCV et est associé de manière indépendante au développement de l'athérosclérose (Halcox et al., 2002; Schachinger et al.,

2000; Suwaidi et al., 2000). Bref, une mesure de différents paramètres de la dysfonction endothéliale pourrait munir les cliniciens d'une information pronostique importante constituant un bon complément à l'information déjà apportée par la présence d'autres facteurs de risque.

### **I.1.3 La strie lipidique**

À son stade précoce, la lésion athéromateuse s'appelle la strie lipidique (figure 2B). Cette lésion est observée chez 65% des enfants âgés de 12 à 14 ans (Worthley et al., 2001) et se compose principalement de macrophages dérivés de monocytes, de cellules spumeuses, de lymphocytes T et de CML. La formation de la strie lipidique fait intervenir plusieurs événements majeurs dont la migration intinale des cellules inflammatoires et des lipoprotéines et la formation des cellules spumeuses. Les cellules inflammatoires migrent dans la paroi vasculaire en réponse à divers facteurs de croissance sécrétés par les cellules vasculaires comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF). Les chémokines, comme la protéine chémoattractive monocytaire-1 (MCP-1), semblent responsables de l'attraction et de l'accumulation des macrophages et des lymphocytes dans la paroi vasculaire. Le fait que des souris déficientes en MCP-1 ou en son récepteur, le CCR2, présentent une diminution drastique du développement des lésions athéromateuses indiquent le rôle crucial de l'infiltration intinale des monocytes dans l'athérogenèse (Chen et al., 1980; Inadera et al., 1992; Tavangar et al., 1992). L'activation des monocytes/macrophages dans la paroi induit l'expression à leur surface d'intégrines liant les molécules d'adhésion et de récepteurs spécifiques aux

molécules chémotactives. Ces interactions ligands-récepteurs contribuent à l'activation des cellules mononuclées et stimulent la prolifération des CML dans la paroi (Figure 2B) (Rauramaa et al., 1980; Simsolo et al., 1992).

Tel que mentionné précédemment, les LDL s'accumulent dans la paroi et y subissent des modifications comme l'oxydation, la glycation (dans le diabète) ou l'agrégation. Ces LDL modifiées constituent une cause majeure de dommage à l'endothélium ou aux CML (Ross, 1999). Piégées dans la paroi, les LDL sont oxydées et internalisées par les macrophages via les récepteurs scavenger, tels le récepteur scavenger-A (SR-A), le CD36 et le LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor-1*) (Itabe, 2003). Ces derniers ne subissent pas de régulation négative par l'accumulation de LDL modifiées dans la cellule, ce qui accentue la formation des cellules spumeuses. Cette captation par les macrophages vise d'abord à protéger l'endothélium des effets négatifs de ces LDL modifiées sur les cellules endothéliales ou les CML. Toutefois, les macrophages sont eux-mêmes activés par les LDL modifiées et dès lors sécrètent des cytokines proinflammatoires. Ces lipoprotéines augmentent aussi l'expression du facteur macrophagique stimulant des colonies (M-CSF), un facteur important pour la survie et la multiplication des macrophages dans la lésion (Pfeifer et al., 1983; Worthley et al., 2001), et du MCP-1 par les cellules endothéliales (Ross, 1999). Ces deux cytokines ainsi que les LDL oxydées favorisent l'accumulation des macrophages dans l'espace sous-endothélial.

Finalement, les LDL oxydées contribuent à amplifier la réponse inflammatoire en agissant comme agents chémotactiques pour les monocytes. On assiste donc à un cercle vicieux où l'inflammation induit la modification des lipoprotéines qui à leur tour favorisent

la réponse inflammatoire. Ce cercle vicieux est maintenu en place par la présence de ces lipides dans la paroi vasculaire.

#### **I.1.4 La lésion avancée ou compliquée**

La lésion avancée est caractérisée par la formation d'une coiffe fibreuse, s'apparentant à un mur séparant la lésion de la lumière vasculaire. Cette coiffe fibreuse est composée de macrophages, de lymphocytes T et de CML et couvre le noyau nécrotique de la lésion. Ce dernier est le résultat de l'accumulation de lipides, de l'apoptose et de la nécrose des cellules vasculaires, notamment les macrophages, et d'une augmentation de l'activité protéolytique (Figure 2C) (Ross, 1999). La présence du noyau nécrotique et la formation de la coiffe fibreuse sont des caractéristiques de la lésion avancée ou compliquée. Entre le noyau nécrotique et la surface endothéliale, l'intima contient des macrophages et des CML avec ou sans gouttelettes lipidiques. Les CML et la matrice extracellulaire normalement présents dans la partie profonde de l'intima cèdent leur place à des particules lipidiques. Les organelles de ces CML peuvent être calcifiées et il a été observé que des particules de calcium étaient présentes dans les noyaux lipidiques de ces lésions (Stary et al., 1995). Celles-ci continuent de prendre de l'expansion par des mécanismes inflammatoires similaires à ceux décrits auparavant. Le développement de la plaque à l'intérieur du vaisseau est compensé par un élargissement de la taille de celui-ci. Ceci constitue le phénomène de remodelage vasculaire (Glagov et al., 1988) et cause un rétrécissement progressif de la lumière vasculaire, limitant le débit sanguin (Stary et al., 1995). La morbidité et la mortalité associées à l'athérosclérose sont largement dues à ce

type de lésions compliquées où une rupture de la surface ou une hémorragie peuvent se produire, occasionnées par différents facteurs décrits dans la prochaine section.

### **I.1.5 La plaque fibreuse instable**

Une érosion ou un amincissement de la coiffe fibreuse est considéré comme un prélude à la rupture de la plaque et est un signe de vulnérabilité de celle-ci. Une plaque vulnérable est caractérisée par une lésion ayant un grand volume, un large noyau lipidique occupant souvent près de 40% du volume de la plaque, une infiltration de cellules inflammatoires, une coiffe très mince et un niveau de néo-vascularisation élevé (Shah, 2003). Plusieurs mécanismes ont été associés à ces caractéristiques.

Le noyau lipidique de ce type de lésion est composé de cholestérol libre, de cristaux de cholestérol et d'esters de cholestérol provenant de lipides ayant infiltrés la paroi artérielle et de débris cellulaires provenant de la mort des cellules spumeuses. Un noyau lipidique volumineux confère un désavantage car il cause une redistribution du stress mécanique aux abords de la plaque, une région sujette à rupture (Richardson et al., 1989). En outre, le noyau lipidique contient un matériel fortement thrombogénique lorsqu'exposé à la circulation sanguine.

Des observations histopathologiques ont démontré que les plaques vulnérables à la rupture contenaient plus de cellules inflammatoires. Ces cellules sont surtout des

macrophages, mais aussi des lymphocytes T et des mastocytes retrouvés à des sites adjacents au site de rupture et autour des aires de néovascularisation (Shah, 2003).

Les principaux constituants structuraux de la coiffe fibreuse sont des molécules de la matrice extracellulaire dont le collagène, l'élastine et les protéoglycans provenant des CML. Les coiffes fibreuses contenant moins de collagène, de protéoglycans et de CML sont plus sensibles à la rupture. L'appauvrissement en certains constituants de la matrice extracellulaire, tel le collagène, résulte d'un déséquilibre entre leur synthèse et leur dégradation. L'augmentation de la dégradation de la matrice est relative à la présence accrue de métalloprotéinases (MMP) sécrétées en majeure partie par les macrophages et les cellules spumeuses, et en moindre importance par les CML et les cellules endothéliales. La perte de collagène dans la coiffe fibreuse peut aussi être attribuée à l'effet inhibiteur de l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), produit par les lymphocytes T, sur l'expression du collagène par les CML et l'effet apoptotique de cette cytokine sur ces cellules (Libby, 1995). Finalement, l'augmentation de la néovascularisation dans la plaque peut faciliter le recrutement des cellules inflammatoires, un phénomène contribuant à son instabilité.

La rupture de la plaque peut se produire de manière spontanée ou être déclenchée par un événement particulier comme une activité physique intense, un traumatisme émotif, l'exposition à des drogues illicites ou une infection. Cette rupture de la plaque mène en général à la formation d'un thrombus qui se manifeste cliniquement par un événement coronarien aigu. Toutefois, la plaque peut subir une rupture silencieuse et ne causer aucune conséquence clinique apparente.

### **I.1.6 Facteurs de risques traditionnels**

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle où les facteurs de risque peuvent exercer un effet additif ou synergique sur le développement de l'athérogénèse. Ces facteurs de risque sont irréversibles ou réversibles, par pharmacothérapie ou par un changement des habitudes de vie. Les facteurs de risques non modifiables bien connus sont l'âge, le sexe et l'histoire familiale. Il est maintenant très bien documenté que le risque de MCV augmente avec l'âge et qu'il est plus important lorsque l'on est de sexe masculin. De plus, une histoire familiale où l'un ou plusieurs membres de la famille ont développé une MCV à un âge précoce constitue un risque élevé, indépendant des autres facteurs de risque de MCV. D'autres facteurs de risque tels que le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'obésité, les dyslipidémies et le diabète de type 2, sont réversibles par médication ou modification des habitudes de vie.

#### **I.1.6.1 Tabagisme**

Une multitude d'études épidémiologiques réalisées à ce jour ont pu mettre en évidence l'effet néfaste du tabagisme. Il constitue une cause majeure de maladies coronariennes, d'accidents cérébro-vasculaires, d'anévrisme aortique et de maladies vasculaires périphériques (Burns, 2003). La fumée secondaire semble aussi dommageable que le tabagisme actif (Leone, 2003). Les risques de MCV sont proportionnels à la quantité et à la durée du tabagisme (Burns, 2003). Cependant, il est encourageant d'apprendre que l'arrêt du tabagisme réduit ces risques de manière significative (Goldenberg et al., 2003). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet pro-athérogénique de la

cigarette tels qu'une inhibition de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, une agrégation plaquettaire accrue, une dysfonction endothéliale et une activation des leucocytes circulants (Lehr, 2000). À cet effet, il a été rapporté que le tabagisme chronique favorise l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (Dovgan et al., 1994). De manière intéressante, il a récemment été constaté que la cigarette pourrait être une source de produits terminaux de glycation (AGEs). En effet, les feuilles de tabac sont séchées en présence de sucres et permettent ainsi la formation des AGEs. Ces glycotoxines sont absorbées par le poumon et se lient par la suite aux protéines sanguines, incluant les lipoprotéines (Singh et al., 2001).

### **I.1.6.2 Hypertension artérielle**

Il existe une relation positive forte et indépendante entre les niveaux de pression sanguine systolique et diastolique et le risque de MCV (Stamler et al., 1993a). Il a été observé que la présence de lésions athéromateuses est rare dans les régions où la pression sanguine est faible (Srikanthan et Dunn, 1997). Une méta-analyse a rapporté une augmentation de l'ordre de 5 fois des événements coronariens lors d'une augmentation de la pression diastolique de 76 à 105 mm Hg (MacMahon et Sharpe, 1990). Les mécanismes conduisant à une athérogénèse accélérée en présence d'une hypertension artérielle ne sont pas encore bien connus. Toutefois, il a été démontré que l'hypertension induit une dysfonction endothéliale et une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire (Rakugi et al., 1996). Elle est aussi associée à une diminution de la

biodisponibilité du NO (Cannon, III, 1998). De plus, l'hypertension peut induire l'activation des protéines kinases mitogéniques activées (MAPK) dans la paroi artérielle, suivie d'une augmentation de l'expression génique de c-fos et c-jun, menant à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Zou et al., 1998) et à la prolifération des CML, un événement clé du développement des plaques athéromateuses (Zou et al., 1998). Une étude randomisée (*HOT-Hypertension Optimal Treatment Study*) a évalué l'effet d'un traitement anti-hypertenseur sur l'incidence des MCV (Hansson et al., 1998) et a pu démontrer une diminution des événements cardiovasculaires en réponse à la réduction de la pression artérielle.

### **I.1.6.3 Obésité**

Le développement de l'obésité n'est pas entièrement compris mais semble dépendant de facteurs sociaux, économiques, culturels, physiologiques, métaboliques et génétiques (Eckel et Krauss, 1998). Il est clair que le mode de vie y joue un rôle prépondérant. En effet, un environnement qui incite à un apport nutritionnel excessif tout en décourageant l'activité physique contribue au développement de l'obésité (Hill et Peters, 1998). Les risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaires sont considérablement augmentés chez les sujets obèses et l'obésité est un facteur prédictif indépendant des maladies coronariennes athérosclérotiques (Manson et al., 1995). Des données récentes suggèrent un rôle plus important de l'obésité viscérale dans la pathophysiologie de l'athérosclérose. Une corrélation positive a été notée entre l'augmentation de la graisse

viscérale et un profil métabolique néfaste, c'est-à-dire une hyperinsulinémie, une diminution de la tolérance au glucose, une dyslipidémie et une augmentation de la pression artérielle (Peiris et al., 1989).

Le tissu adipeux est de plus en plus reconnu comme un organe sécrétant des molécules biologiquement actives pouvant réguler le métabolisme énergétique, par des mécanismes endocrine et paracrine. Il est maintenant reconnu que l'obésité est un état inflammatoire et que le facteur de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6) sont des cytokines sécrétées par les adipocytes. L'expression du TNF $\alpha$  corrèle positivement avec l'adiposité (Bullo et al., 2002) et est fortement augmentée dans le tissu adipeux des patients obèses (Kern, 1997). Une hypersécrétion insulinique et une résistance à l'insuline sont deux caractéristiques bien connues de l'obésité. Le TNF $\alpha$  semble jouer un rôle dans l'insulino-résistance (IR) même si le mécanisme exact par lequel il y contribue est encore mal connu. On sait cependant que le TNF $\alpha$  interfère avec la signalisation de l'insuline en diminuant l'autophosphorylation de son récepteur (Hotamisligil et al., 1994a) et du substrat majeur du récepteur de l'insuline, le IRS-1. La sécrétion du TNF $\alpha$  par le tissu adipeux corrèle avec les niveaux d'IR chez les sujets obèses (Kern et al., 2001). De nos jours, il est postulé que le TNF $\alpha$  jouerait le rôle d'*adipostat* visant à prévenir le développement d'une obésité encore plus importante en inhibant l'activité de la lipoprotéine lipase adipocytaire et en induisant une IR (Hube et Hauner, 1999). Par ces effets, le TNF $\alpha$  pourrait contribuer à réduire l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux (Coppack, 2001). L'état inflammatoire associé à l'obésité peut avoir un impact encore plus important sur le

développement de l'athérosclérose s'il est associé à une IR et à une dysfonction endothéliale, comme c'est le cas entre autres chez les sujets diabétiques de type 2. L'interaction entre ces conditions sera discutée en détails plus loin.

#### **I.1.6.4 Dyslipidémies**

##### **I.1.6.4.1 Hypercholestérolémie**

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Elle est causée par une mutation dans le gène du récepteur hépatique aux LDL, empêchant leur clairance normale de la circulation et favorisant leur accumulation dans la paroi vasculaire. C'est la maladie génétique la plus commune en Europe et aux États-Unis, affectant, sous sa forme hétérozygote, 1 personne sur 500 (Durrington, 2003). Dans la population canadienne française ou sud africaine, où l'on retrouve l'effet fondateur, la fréquence de la mutation atteint 1/200 et 1/70, respectivement (Marks et al., 2003). L'HF est associée à une augmentation de 96 fois des risques de mortalité cardiovasculaire comparativement à la population générale, particulièrement avant l'âge de 45 ans (Hegele, 2002). Non traités, plus de la moitié des hommes et environ 15% des femmes atteints d'hypercholestérolémie mourront avant l'âge de 60 ans (Marks et al., 2003; Slack, 1969). L'hypercholestérolémie peut aussi être causée, bien que plus rarement, par un défaut génétique de l'apolipoprotéine B, le constituant de la particule de LDL permettant sa liaison au récepteur (Myant, 1993). Ce défaut familial

d'apolipoprotéine B a une fréquence de 1/600 dans la population générale et ne cause pas d'hyperlipidémie très sévère (Myant, 1993).

L'hypercholestérolémie polygénique est une forme d'hypercholestérolémie où interviennent des facteurs génétiques et environnementaux. À ce sujet, il est important de noter que la cause la plus commune d'une augmentation de LDL cholestérol n'est pas un défaut génétique mais plutôt une surproduction hépatique de lipoprotéines de très basse densité (VLDL), qui sont transformées rapidement en LDL de sorte que le niveau de triglycérides (TG) reste stable mais que le niveau de cholestérol augmente (Durrington, 2003). Les facteurs étiologiques associés à cette anomalie métabolique sont un excès d'apport en graisse alimentaire, particulièrement les gras saturés, et l'obésité. Les facteurs génétiques peuvent aussi déterminer la sensibilité de chaque individu à une charge alimentaire en cholestérol (Durrington, 2003). Dans l'hypercholestérolémie polygénique, les risques de MCV sont associés au niveau de cholestérol LDL et une relation exponentielle existe entre les niveaux de cholestérol sérique et les MCV (Law et al., 1994).

L'hyperlipidémie familiale combinée est une maladie fréquente, affectant 1/50 personnes (Durrington, 2003). Elle se présente sous la forme d'une hypercholestérolémie isolée ou d'une hypertriglycéridémie isolée ou encore d'une combinaison des deux. Une augmentation des TG augmente de manière significative le risque de MCV lorsqu'elle est combinée à une hypercholestérolémie.

#### I.1.6.4.2 Hypertriglycémie

Plusieurs types de dyslipidémies peuvent causer une augmentation des TG sanguins. D'abord, tel que mentionné ci-haut, l'hyperlipidémie familiale combinée peut inclure une hypertriglycémie. L'hypertriglycémie de type V quant à elle, est caractérisée par une forte augmentation des chylomicrons et des VLDL. Celle-ci est le résultat d'une augmentation de la production hépatique de VLDL, causée par un défaut génétique ou secondaire à l'obésité, le diabète, l'alcool ou l'administration d'estrogènes. Cette augmentation de VLDL est associée à une réduction de leur lipolyse et à celle des chylomicrons secondaire à divers facteurs tels que l'hypothyroïdie, le diabète ou l'administration de  $\beta$ -bloquants. Dans l'ensemble, la fréquence d'une hypertriglycémie sévère est d'environ 1/1000 (Durrington, 2003). Il faut souligner que ce désordre métabolique est plus fréquent dans la population diabétique de type 2.

Plus rarement, l'hypertriglycémie peut être causée par une déficience familiale en lipoprotéine lipase (LPL), l'enzyme qui hydrolyse les TG des chylomicrons et des VLDL. Cette maladie a un trait autosomique récessif. Elle est souvent causée par des mutations du gène de la LPL, mais peut, occasionnellement, être causée par une déficience en apolipoprotéine CII, le cofacteur de la LPL.

L'hypothèse selon laquelle l'hypertriglycémie constitue un facteur de risque indépendant des MCV tend de plus en plus à être vérifiée. Une méta-analyse réalisée par Hokanson et Austin et incluant dix-sept études prospectives de cohorte, dénombant un total de 46 000 hommes et 11 000 femmes, a montré que les niveaux de TG constituent un

facteur de risque indépendant des MCV (Austin et al., 1998). Cette étude a démontré qu'une augmentation de 1 mmol/L de TG est associée à une augmentation du risque de MCV, avec un risque relatif chez l'homme de 1.3 et de 1.8 chez la femme (Austin, 1999). Après ajustement pour d'autres facteurs de risque, incluant le HDL cholestérol, ces risques relatifs diminuaient mais demeuraient statistiquement significatifs. Les formes les plus communes d'hypertriglycéridémie familiale sont l'hyperlipidémie familiale combinée (FCHL) et l'hypertriglycéridémie (FHTG). Une récente étude a évalué le risque de mortalité cardiovasculaire chez les membres de ces familles et le niveau plasmatique de TG comme facteur prédictif de la mortalité (Austin et al., 2000). Les résultats indiquent que les niveaux de TG prédisent la mortalité cardiovasculaire dans les familles comptant un membre souffrant de FHTG.

Le bezafibrate est un médicament ayant pour effet de diminuer les niveaux de TG et d'augmenter les niveaux de HDL. Récemment, l'étude *Bezafibrate Infarction Prevention*, une étude randomisée à double insu, a vérifié l'effet du bezafibrate sur une cohorte de 3090 patients. Les résultats ont démontré une réduction de 39.5% des risques d'infarctus du myocarde (IM) en réponse au bezafibrate chez les patients hypertriglycéridémiques (*BIP study*, 2000). Cependant, dû au fait que les HDL étaient augmentées par ce médicament, l'effet bénéfique d'une réduction de TG sur les risques d'IM ne peut être démontré de manière indépendante des HDL. Dans le même ordre d'idée, la *Helsinki Heart Study* a rapporté qu'une baisse des niveaux de LDL et de TG induisait une diminution de 34% de l'incidence d'IM (Frick et al., 1987). Cette réduction était plus importante que dans la *Lipid Research Clinics Study* où une diminution des niveaux de LDL seuls, réduisait le

risque d'IM de 19% (Kesaniemi et Grundy, 1984). Prises dans leur ensemble, ces études suggèrent qu'une réduction des TG sériques soit bénéfique mais de façon indirecte, c'est-à-dire via l'amélioration d'un ou plusieurs éléments du profil lipidique. La relation précise entre les TG et les MCV reste à préciser.

#### **I.1.6.4.3 Déficience en HDL**

Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté qu'une diminution des niveaux de HDL était associée à une augmentation des risques de MCV (Durrington, 2003). Deux types de déficiences en HDL ont été répertoriés: les déficiences primaires et secondaires. Les déficiences primaires, ou alaphipoprotéïnémie, trouvent leur source dans des mutations génétiques telles celles portant sur le gène ABCA1 (maladie de Tangier) ou l'apo AI. La déficience en HDL peut aussi être secondaire à l'obésité, au syndrome métabolique ou au diabète de type 2. Une multitude d'effets protecteurs des HDL ont été identifiés ces dernières années (Viles-Gonzalez et al., 2003). D'abord, les HDL sont les éléments cruciaux du transport inverse du cholestérol, permettant le transport du cholestérol extra-hépatique vers le foie. Les HDL comprennent divers antioxydants qui atténuent l'oxydation des LDL. Une de ces enzymes antioxydantes transportées par ces lipoprotéines est la paraoxonase (PON). Cette enzyme catalyse la rupture des phospholipides oxydés des LDLs. Ceci a pour effet de prévenir la production de cytokines et l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire induites par les LDL oxydées (Mertens et al., 2003). Les HDLs peuvent aussi améliorer la fonction endothéliale en inhibant l'expression des

molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Cockerill et al., 2001) et en augmentant l'expression du eNOS (Lupattelli et al., 2002). Les HDL ont aussi des propriétés antithrombotiques (Viles-Gonzalez et al., 2003), par leurs actions inhibitrices sur le TF et le facteur X (Sambola et al., 2003), et par leurs propriétés stimulantes sur l'activité anticoagulante de la protéine C (Rota et al., 1998).

### **I.1.6.5 Diabète de type 2**

Les sujets diabétiques de type 2 ont un risque augmenté de 2 à 4 fois de développer une maladie coronarienne (Luscher et al., 2003). Les MCV sont aussi la principale cause de morbidité et de mortalité chez ces patients. Une section entière de cette thèse sera consacrée au diabète de type 2.

## **I.1.7 Facteurs de risque non traditionnels**

### **I.1.7.1 Facteurs inflammatoires**

#### **I.1.7.1.1 Protéine C-réactive (CRP)**

La protéine C-réactive (CRP) est considérée comme le réactif majeur de la phase aigüe de la réponse inflammatoire. Les niveaux plasmatiques de CRP s'élèvent très rapidement en réponse à un stimulus inflammatoire pouvant atteindre des niveaux de 1000 fois supérieurs aux niveaux normaux. Elle est exprimée principalement dans le foie, mais

également dans les neurones (Yasojima et al., 2000), les macrophages (Dong et Wright, 1996), le rein (Jabs et al., 2003) et le tissu adipeux (Ouchi et al., 2003a).

Plusieurs études ont démontré que les niveaux plasmatiques de CRP corrélaient avec le degré d'adiposité chez des sujets sains ainsi qu'avec les niveaux de glycémie et d'insulinémie chez les sujets diabétiques (Frohlich et al., 2000; Hak et al., 1999; Visser et al., 1999; Yudkin et al., 1999). Un niveau élevé de CRP est un facteur prédictif indépendant de risque de MCV (Rattazzi et al., 2003). La première évidence de cette corrélation a été documentée par Ridker et coll, dans la *Physicians Health Study* comprenant 14 916 sujets masculins, où il a été démontré que les niveaux de CRP prédisaient le risque d'IM (Ridker et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés par des études ultérieures menées sur de larges cohortes et impliquant différents événements cardiovasculaires (Rattazzi et al., 2003). De manière intéressante, il a été rapporté que si l'effet prédictif était vérifiable autant chez l'homme que chez la femme, le risque de MCV était plus élevé chez la femme, pour un même niveau de CRP (Tracy et al., 1997). Très récemment, le groupe de Ridker et coll. a rapporté, dans une étude prospective comprenant 28 000 femmes, que la CRP était un meilleur facteur prédictif des risques de MCV que le LDL cholestérol (Ridker et al., 2002). Les risques de MCV associés aux niveaux de CRP peuvent être séparés en trois grades. Une concentration plasmatique de CRP de moins de 1 µg/ml est associée à un risque faible de MCV, une concentration oscillant de 1 à 3 µg/ml à un risque intermédiaire et plus de 3 µg/ml, à un risque élevé (Yeh et Willerson, 2003). Au vu de ses études, il a été proposé que la CRP puisse être utilisée comme marqueur spécifique et sensible du risque de MCV. Outre ce rôle de facteur ou marqueur de risque

des MCV, la CRP pourrait aussi jouer un rôle direct dans le développement des lésions athéromateuses, en favorisant un état de dysfonction endothéliale, en induisant l'activation des macrophages et CMLs et en favorisant la formation des cellules spumeuses.

En effet, la CRP est présente dans les lésions athérosclérotiques (Reynolds et Vance, 1987) où elle semble jouer le rôle de molécule chémoattractive pour les monocytes, contribuant à leur recrutement dans la paroi vasculaire (Torzewski et al., 2000). Des études *in vitro* ont démontré que la CRP stimule l'activation des monocytes en induisant la sécrétion de cytokines inflammatoires, telles l'interleukine (IL-1) et le  $\text{TNF}\alpha$  (Galve-de Rochemonteix et al., 1993), et l'expression du TF (Cermak et al., 1993). De plus, la CRP module la fonction des cellules endothéliales en induisant l'expression de molécules d'adhésion et du PAI-1, ainsi que la sécrétion de MCP-1, d'endothéline-1 et d'IL-6 (Devaraj et al., 2003; Pasceri et al., 2000; Pasceri et al., 2001; Verma et al., 2002a). La CRP contribue aussi à créer un état de dysfonction endothéliale en inhibant l'expression de eNOS (Venugopal et al., 2002a; Verma et al., 2002b). En outre, elle stimule la sécrétion de MCP-1 et d'IL-6 par les CMLs, favorisant leur prolifération (Hattori et al., 2003). Finalement, il a été rapporté que la CRP participait à la formation des cellules spumeuses en causant l'agrégation des LDL et leur captation par les macrophages (Fu T et al, *biochem J*, 2002). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que la CRP puisse contribuer de manière directe au développement de l'athérosclérose.

### I.1.7.1.2 Lipoprotéine(a)

La lipoprotéine(a) [Lp(a)] est une molécule similaire dans sa structure au LDL cholestérol, contenant en surplus une large glycoprotéine nommée apolipoprotéine(a). La Lp(a) entre en compétition avec le plasminogène pour ses sites de liaison, ce qui cause une réduction de la synthèse de plasmine et une inhibition de la fibrinolyse (Loscalzo et al., 1990). Diverses études appuient le concept de l'athérogénécité de la Lp(a). Tout d'abord, il a été observé qu'elle augmentait le dépôt du cholestérol dans la paroi artérielle (Rath et al., 1989), la formation des cellules spumeuses (Naruszewicz et al., 1992), la production de radicaux libres oxygénés par les monocytes (Riis et al., 1994), la prolifération des CMLs (Grainger et al., 1993), et l'activité chémotactique des monocytes (Poon et al., 1997).

Malgré ces données, la controverse entourant la Lp(a) comme facteur de risque des MCV est toujours très présente (Harjai, 1999). Alors que des études prospectives, rétrospectives et une méta-analyse récente révisant 27 études et comprenant 5436 sujets (Danesh et al., 2000a) ont rapporté une association indépendante entre des niveaux élevés de Lp(a) et la présence et le degré de maladies coronariennes artérielles, plusieurs autres études n'ont pas documenté cette relation. Ainsi, la *Physicians Health Study*, comprenant 14 916 hommes, n'a pas observé de corrélation entre la Lp(a) et le risque d'IM (Ridker et al., 1993; Ridker et al., 1995). Des études supplémentaires semblent donc nécessaires afin de déterminer si la Lp(a) est un facteur causal dans l'apparition des maladies coronariennes.

### **I.1.7.1.3 Fibrinogène**

Le fibrinogène est une glycoprotéine qui agit dans la dernière étape de la voie de la coagulation en réponse à un dommage vasculaire et/ou tissulaire. Le fibrinogène est clivé par la thrombine pour former des fragments de fibrine, qui sont les composants les plus abondants des caillots sanguins. Le fibrinogène, comme la CRP, est un réactif de la phase aigüe synthétisé par le foie. Les niveaux de fibrinogène peuvent s'élever jusqu'à 4 fois en réponse à un stimulus inflammatoire ou infectieux (Hackam et Anand, 2003).

L'implication possible du fibrinogène dans l'athérogénèse a été mise en évidence par diverses études épidémiologiques. Ces études ont montré une association positive entre les niveaux plasmatiques de fibrinogène et les MCV (Harjai et al., 1999). Deux récentes méta-analyses comprenant 18 et 22 études prospectives à long terme, ont confirmé ces données en documentant une augmentation du risque relatif de MCV chez les individus ayant un niveau élevé de fibrinogène (Danesh et al., 1998; Maresca et al., 1999). Le fibrinogène est modulé par divers facteurs de risque impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Par exemple, une relation dose dépendante a été établie entre la quantité de cigarettes fumées et les niveaux de fibrinogène (Wilkes et al., 1988). Le niveau de fibrinogène est aussi plus élevé dans le diabète, l'hypertension, l'obésité et chez les individus ayant un mode de vie sédentaire (Maresca et al., 1999). L'arrêt du tabagisme, la perte de poids, l'exercice et une consommation d'alcool modérée réduisent les niveaux de fibrinogène plasmatiques (Ernst et Resch, 1995). Davantage d'études cliniques sont toutefois nécessaires pour établir si le fibrinogène joue un rôle causal dans l'athérogénèse ou s'il est simplement un marqueur du degré de dommage vasculaire.

## I.1.7.2 Facteurs infectieux

### I.1.7.2.1 Chlamydia pneumonia

Le *C. pneumonia* est un pathogène commun chez l'humain responsable d'infections des voies respiratoires (Kalayoglu et al., 2002). Diverses études tendent à démontrer une association entre l'athérosclérose et le *C. pneumonia*. Premièrement, des études épidémiologiques ont rapporté que les patients avec MCV avaient une augmentation des niveaux circulants d'anticorps anti-*C. pneumonia*. Deuxièmement, une quarantaine d'études provenant de différents groupes ont documenté la présence de *C. pneumonia* dans environ la moitié des lésions athéromateuses et il a été démontré que ce pathogène isolé des plaques athéromateuses pouvait infecter des cellules in vitro. Troisièmement, des études effectuées in vitro ont rapporté que le *C. pneumonia* induisait des effets pro-athérogéniques dans diverses cellules vasculaires. Ainsi, il a été documenté que des monocytes infectés pouvaient transmettre le virus à des cellules endothéliales (Gaydos, 2000) et que des monocytes humains infectés par le *C. pneumonia* adhéraient plus facilement aux cellules endothéliales (Kalayoglu et al., 2001). Il a aussi été rapporté que les CML réagissaient à l'infection des cellules endothéliales en proliférant (Coombes et Mahony, 1999), tandis que leur infection directe causait une induction de la sécrétion de cytokines inflammatoires (Miller et al., 2000). De la même manière, les macrophages infectés produisaient aussi plus de cytokines inflammatoires. Enfin, il a été rapporté que le *C. pneumonia* pouvait favoriser la déstabilisation de la plaque en induisant la production de métalloprotéinases (Kol et al., 1998; Vehmaan-Kreula et al., 2001). Quatrièmement, des études menées in vivo ont démontré que ce pathogène favorisait l'initiation et la progression des lésions

athéromateuses chez des animaux susceptibles à l'athérosclérose tels que des souris apoE<sup>-/-</sup> et LDLR<sup>-/-</sup>. Les résultats de la majorité de ces études démontraient une accélération du développement de l'athérosclérose chez les animaux en réponse au *C. pneumonia* (Frishman et Ismail, 2002). Finalement, des études préliminaires vérifiant l'effet de traitements par antibiotiques visant ce pathogène chez des patients ayant une maladie coronarienne artérielle, ont constaté une réduction des événements coronariens.

Il faut cependant souligner que ces résultats ne font pas l'unanimité dans la communauté scientifique. Ainsi, des études plus récentes et comprenant de plus larges cohortes d'individus n'ont démontré aucun effet bénéfique d'un traitement par antibiotiques (Danesh et al., 2000b). Dans le même ordre d'idée, une récente revue de littérature comprenant 15 études et 3169 cas n'a pas permis de conclure à une association entre le *C. pneumonia* et les MCV (Danesh et al., 2000c). Plusieurs études cliniques sont actuellement en cours pour vérifier si l'éradication de ce pathogène pourrait réduire, au moins partiellement, le développement de l'athérosclérose.

#### **I.1.7.2.2 Helicobacter pylori**

L'*H. pylori* est un organisme gram-négatif qui infecte l'épithélium gastrique et est la cause majeure de l'ulcère d'estomac (Mendall et al., 1994; Strachan et al., 1998). L'hypothèse selon laquelle le *H. pylori* pourrait moduler le profil lipidique a été vérifiée par Niemela et coll. dans une étude cas-témoins où ils ont documenté la présence d'anticorps

anti- *H. pylori* chez 64 % des patients coronariens comparativement à 53% chez les témoins (Niemela et al., 1996). Dans cette étude, les sujets *H. pylori* positifs démontraient une augmentation des niveaux sériques de TG et une diminution des niveaux de HDL. De manière similaire, des études ont documenté une augmentation des niveaux de TG et de VLDL pendant une infection par *H. pylori* tandis que les niveaux de LDL et de HDL diminuaient (Murray et al., 1995; Sammalkorpi et al., 1988). À l'inverse, d'autres études ont rapporté une association faible entre la présence de *H. pylori* et l'athérosclérose (Frishman et Ismail, 2002). Par exemple, dans la *Physicians Health Study*, comprenant 445 hommes ayant subi un IM et 445 hommes contrôles, aucune association n'a été trouvée entre le *H. pylori* et le risque d'IM (Ridker et al., 2001). L'implication du *H. pylori* dans le développement des MCV reste donc toujours controversée.

### **1.1.7.3 L'hyperhomocystéinémie**

L'hyperhomocystéinémie (Hhcy) se définit comme une élévation des niveaux normaux de la concentration d'homocystéine (hcys) plasmatique. L'Hhcy se classe en trois catégories soit : modérée (16-30  $\mu\text{M}$ ), intermédiaire (31-100  $\mu\text{M}$ ) et sévère (>100  $\mu\text{M}$ ) (Hankey et Eikelboom, 1999). L'Hhcy est un facteur de risque indépendant des MCV (Clarke et al., 1991; Robinson et al., 1998). Une augmentation des niveaux plasmatiques (>15 $\mu\text{M}$ ) d'hcys est présente chez environ 8% de la population générale et chez 20-40% des patients atteints d'une maladie vasculaire coronarienne ou périphérique (Fonseca et al., 1999). L'Hhcy peut être causée par un défaut génétique ou par une déficience

nutritionnelle. La mutation la plus commune causant l'Hhcys est une mutation ponctuelle (substitution C-->T du nucléotide 677) dans le gène codant pour l'enzyme N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-méthyltétrahydrofolate réductase. La plupart des personnes sont hétérozygotes pour cette mutation, une déficience de type homozygote de ce gène étant plus rare. Il existe en outre 60 mutations du gène codant pour la cystathionine-β-synthase (CβS). Ces mutations sont les causes les mieux connues d'Hhcys. Comme décrit précédemment, la vitamine B<sub>12</sub>, la vitamine B<sub>6</sub> et le folate sont aussi importants dans le métabolisme de la méthionine. Étant donné que ces trois éléments sont inversement reliés aux niveaux plasmatiques d'hcys, les gens souffrant d'une carence en folate, en vitamine B<sub>12</sub> ou en vitamine B<sub>6</sub> sont à risque accru de développer une Hhcys (Ueland et Refsum, 1989).

#### **I.1.7.3.1 L'homocystéine, un intermédiaire du métabolisme de la méthionine**

L'hcys est un acide aminé contenant un groupement sulfure, dérivé du métabolisme de la méthionine (Figure 3) (Nygard et al., 1999; Welch et al., 1997). La méthionine est un acide aminé essentiel qui provient des protéines de la diète. Après sa formation, l'hcys peut soit entrer dans le cycle de reméthylation soit dans la voie de transsulfuration. Dans le cycle de reméthylation, l'hcys est recyclée en méthionine par la méthionine synthase. Le 5,10-méthyltétrahydrofolate joue le rôle de donneur de groupement méthyl dans cette réaction et la vitamine B<sub>12</sub> est le cofacteur essentiel de cette enzyme. Le tétrahydrofolate généré par cette réaction peut être utilisé par la méthyltétrahydrofolate réductase pour boucler le cycle. Si un excès de méthionine est présent, ou si une synthèse de cystéine est requise par l'organisme, l'hcys peut se diriger dans la voie de transsulfuration. Dans cette voie, l'hcys,

conjuguée à la sérine, est transformée en cystathionine par la CBS, qui nécessite la vitamine B<sub>6</sub> pour catalyser la réaction. La cystathionine sera par la suite hydrolysée pour former la cystéine. L'hcys se retrouve dans le plasma sous différentes formes (Hankey et Eikelboom, 1999). Elle peut se présenter sous sa forme thiol libre (1%), ou liée à des protéines plasmatiques, surtout l'albumine, par un lien disulfure (70-80%). Elle peut aussi se combiner à elle-même ou avec d'autres thiols, incluant la cystéine (20-30%). L'hcys totale inclue toutes ces formes et se retrouve dans le plasma à des niveaux physiologiques de 5 à 15  $\mu\text{M}$ .

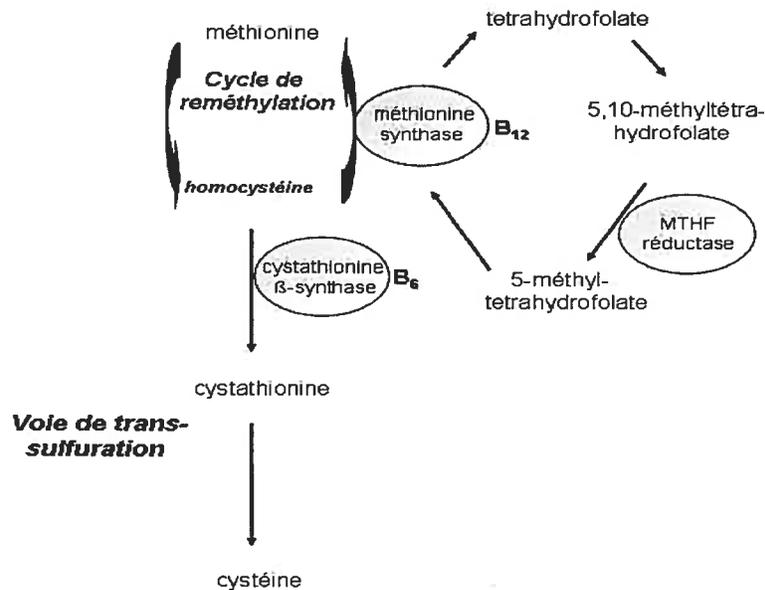


Figure 3. Métabolisme de l'hcys.

### **I.1.7.3.2 Mécanismes par lequel l'hcys exerce son effet pro-athérogénique**

Le(s) mécanisme(s) par lequel(s) l'hcys exerce son effet pro-athérogénique n'est (ne sont) pas encore bien connu(s). Il a été proposé que l'hcys puisse, en augmentant les niveaux de stress oxydatif ou par d'autre(s) mécanisme(s), induire un dommage à l'endothélium vasculaire.

#### *Hcys et dysfonction endothéliale*

Divers arguments suggèrent que l'Hhcys puisse induire un état de dysfonction endothéliale in vivo. Ainsi, chez des souris déficientes en CBS (Eberhardt et al., 2000), une inactivation du NO avec altération de la vasodilatation endothéliale a été observée. En outre, chez le singe hyper-homocystéinémique, une surexpression de la diméthylarginine asymétrique (ADMA), un inhibiteur endogène du NO, a été démontrée (Boger et al., 2000). In vitro, l'hcys augmente l'expression génique et la sécrétion du PAI-1 par les cellules endothéliales et musculaires lisses (Midorikawa et al., 2000). L'hcys inhibe aussi la production d'endothéline-1, un peptide vasoconstricteur, par les cellules endothéliales (Demuth et al., 1999). Plus récemment, il a été démontré que l'hcys induisait l'expression de MCP-1 par les cellules endothéliales (Poddar et al., 2001; Zhang et al., 2003) et les monocytes humains (Zeng et al., 2003) ainsi que l'expression de son récepteur, CCR2, dans la lignée monocyttaire humaine THP-1 (Wang et O K, 2001).

### *Hcys et stress oxydatif*

Il a été suggéré que l'hcys puisse induire un état de dysfonction endothéliale via une augmentation des niveaux de stress oxydatif. Ainsi, plusieurs études ont démontré une synergie entre l'hcys et divers métaux comme le cuivre ou le fer pour la formation d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) et l'induction d'un dommage endothélial (Hultberg et al., 1997; Starkebaum et Harlan, 1986). Une étude récente a démontré qu'une concentration élevée d'hcys plasmatique est associée, chez l'homme, à des niveaux accrus de peroxydation lipidique in vivo (Voutilainen et al., 1999). De plus, il a été rapporté que la détérioration de la fonction endothéliale par l'hcys est réversible par certaines vitamines antioxydantes (Nappo et al., 1999). L'observation que l'hcys augmente l'activité de diverses enzymes antioxydantes dont la glutathione peroxydase et la superoxyde dismutase suggère qu'un accroissement des niveaux d'hcys plasmatiques représente bel et bien un stress oxydatif, induisant une augmentation compensatrice de l'activité de diverses enzymes antioxydantes visant à protéger l'endothélium (Moat et al., 2000). Dans le même ordre d'idée, une corrélation positive a été démontrée chez des patients déficients en CBS entre les niveaux d'homocystéine et ceux de superoxyde dismutase plasmatiques, un élément antioxydant important dans le tissu vasculaire (Wilcken et al., 2000). L'idée que l'hcys puisse induire un stress oxydatif est toutefois encore controversée. En effet, une étude récente réalisée chez des sujets sains chez qui une Hhcys temporaire était induite par une ingestion de méthionine, a démontré que la dysfonction endothéliale causée par l'hcys est médiée par un défaut de l'activité du NO mais sans changement du statut oxydatif (Chao et al., 2000). Ces résultats contredisent ceux obtenus chez des animaux

hyperhomocystéinémiques démontrant que la dysfonction endothéliale générée par l'hcys est inhibée par l'antioxydant glutathione ou la glutathione peroxydase (Weiss et al., 2003). Ils sont aussi en opposition avec ceux générés chez des sujets souffrant de MCV démontrant une corrélation négative entre les niveaux d'hcys plasmatique et ceux de vitamines antioxydantes telles que la vitamine E et A (Yardim-Akaydin et al., 2003). Ces résultats ainsi que ceux démontrant qu'une supplémentation en acide folique, qui agit comme substrat de la voie de reméthylation de l'hcys, (Figure 3), normalise les niveaux plasmatiques d'hcys et améliore la fonction endothéliale (Das, 2003), suggèrent que l'usage de ces agents puisse réduire l'athérogénèse accélérée associée à l'Hhcys. Reste maintenant à savoir l'impact à long terme d'une supplémentation en acide folique, vitamine B<sub>12</sub> ou B<sub>6</sub> sur le développement des MCV. Des études sont présentement en cours afin de vérifier cette importante avenue thérapeutique.

#### *Autres mécanismes impliqués dans l'effet pro-athérogénique de l'hcys*

Plusieurs autres mécanismes ont été proposés pour expliquer les propriétés athérogéniques de l'hcys. D'abord, il a été démontré que l'hcys stimule la prolifération des CML (Tsai et al., 1994), un phénomène important de l'athérogénèse. Cette stimulation se fait via l'activation de la protéine kinase C (PKC) et par l'induction des facteurs de transcription c-fos et c-myb (Dalton et al., 1997). Cet effet semble aussi impliquer la voie des MAPK (Brown et al., 1998; Woo et al., 2000), l'augmentation de la cycline A, de la kinase associée à la cycline A (Tsai et al., 1996) ainsi que de la kinase dépendante de la cycline dans le tissu aortique (Lubec et al., 1996). Une autre sérine/thréonine kinase a

récemment été impliquée dans la régulation de la mitogénèse des cellules musculaires lisses, la smap8, et semble agir en amont des kinases extracellulaires régulées (ERK 1/2) et des ERK 1/2 mitogéniques (MEK 1/2) (Nishimoto et al., 2003). L'hcys facilite aussi l'aggrégation plaquettaire, l'oxydation des lipoprotéines et active la voie de la coagulation (Durand et al., 1997). Un récepteur des LDL oxydées nouvellement identifié dans les cellules endothéliales, le LOX-1, est surexprimé en réponse à l'hcys (Nagase et al., 2001). Plus récemment, un lien entre l'hcys et le métabolisme du cholestérol a été suggéré. En effet, l'hcys induit l'expression génique et protéique de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCoA réductase) par les cellules endothéliales (Li et al., 2002a). La concentration de cholestérol intracellulaire s'en trouve ainsi augmentée. Ceci suggère un nouveau mécanisme par lequel l'hcys exerce son effet pro-athérogénique.

#### **I.1.7.4 Produits terminaux de glycation (AGEs)**

##### **I.1.7.4.1 Formation des AGEs**

Les sucres réducteurs comme le glucose, présents en grande quantité dans le sérum de sujets diabétiques, peuvent réagir, de manière non-enzymatique, avec les groupes amines des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Cette modification se produit par une série de réactions formant, comme intermédiaires, des bases de Schiff et des produits d'Amadori, et aboutissant à la formation de produits finaux, les AGEs. Ce processus a été nommé réaction de Maillard et est illustré à la figure 4. In vivo, le glucose est le sucre réducteur le plus abondant et la lysine est la principale amine primaire. Il n'est donc pas

surprenant de constater que le produit précoce de glycation majeur soit la base de Schiff glucosyl-lysine. La formation d'une base de Schiff s'effectue rapidement et est réversible (figure 4). Par contre, les réarrangements ultérieurs se font plus lentement, s'étalant sur quelques jours ou même quelques semaines (Beisswenger et al., 2001). La formation des AGEs est un processus non enzymatique, lent et irréversible pouvant prendre jusqu'à plusieurs semaines et affectant donc préférentiellement des protéines ayant une longue demie vie (Singh et al., 2001). Ces dernières incluent les protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, la myéline, la tubuline et le fibrinogène.

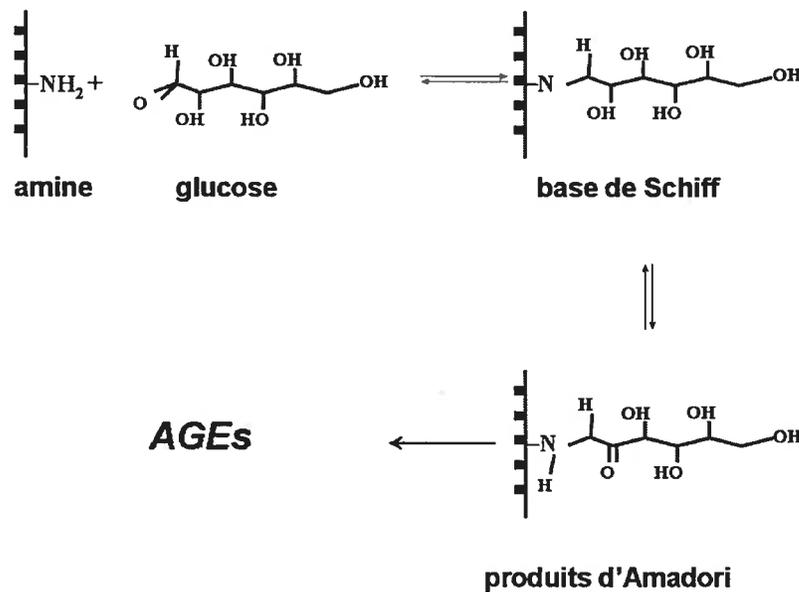


Figure 4. Formation des AGEs.

#### **I.1.7.4.2 Effets pro-athérogéniques des AGEs**

Plusieurs études suggèrent que les AGEs puissent jouer un rôle causal dans le développement des complications macrovasculaires associées au diabète de type 2. D'abord, la présence des AGEs a été établie dans le plasma, les tissus et la paroi vasculaire des sujets diabétiques de type 2 (Hammes et al., 1998; Sun et al., 1998; Wautier et Guillausseau, 1998). Ensuite, une corrélation a été démontrée entre la formation des AGEs et les changements physicochimiques se déroulant dans les tissus vasculaires des diabétiques (Bailey et al., 1993; Dyer et al., 1991; Fu et al., 1994; Vlassara et al., 1994).

De plus, la co-localisation des AGEs et de leur récepteur (RAGE) a été démontrée dans les lésions athérosclérotiques des diabétiques (Li et al., 1995) et une corrélation positive a été observée entre la concentration de AGEs dans les tissus et la sévérité des lésions athéromateuses (Stitt et al., 1997). Les AGEs peuvent se lier aux macrophages dans la paroi vasculaire via le RAGE et divers autres récepteurs scavenger (Araki et al., 1995). Il est possible de ralentir le développement accéléré de l'athérosclérose dans le diabète expérimental par l'injection d'une forme soluble de RAGE, indiquant l'importance de l'interaction AGE-RAGE dans l'athérogénèse associée au diabète (Park et al., 1998). Cette interaction est associée à une augmentation de stress oxydatif dans la cellule et à d'autres réponses pro-athérogéniques, comme la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (Khechai et al., 1997; Kirstein et al., 1992a; Kirstein et al., 1992b; Vlassara et al., 1988; Vlassara, 1994; Vlassara, 1994). Il semble aussi que le stress oxydatif généré par la liaison des AGEs au RAGE soit médié, du moins en partie, par la nicotinamide adénosine

dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Wautier et al., 2001). Il est bien établi que le facteur nucléaire NF-kB est sensible au stress oxydatif induit par les AGEs et régule une multitude de gènes pouvant être impliqués dans l'athérogénèse. Plusieurs récentes études ont identifié ces gènes. D'abord, l'expression endothéliale du TF, un facteur pro-thrombotique augmenté chez les diabétiques de type 2, est stimulée par les AGEs (Bierhaus et al., 1997). L'expression endothéliale de l'endothéline-1 est aussi augmentée en réponse aux AGEs par un mécanisme impliquant le NF-kB (Quehenberger et al., 2000). De la même manière, les AGEs stimulent l'expression macrophagique de différents récepteurs aux LDL oxydées, contribuant ainsi à la formation de cellules spumeuses (Iwashima et al., 2000). Les AGEs induisent aussi une réponse inflammatoire. En effet, ils stimulent l'expression de MCP-1 et d'IL-6 par les CML à travers la cascade de signalisation des ERKs, c-fos, AP-1 et via l'activation du NF-kB (Hattori et al., 2002). Plus récemment, Shanmugam N et coll, ont démontré que les AGEs induisaient l'expression génique de la cyclooxygénase-2 (COX-2) par les monocytes humains (Shanmugam et al., 2003).

Les AGEs peuvent aussi induire un état de dysfonction endothéliale. Il a été démontré que les AGEs interfèrent avec l'enzyme eNOS, responsable de la synthèse du NO, diminuant ainsi la vasodilatation endothéliale dépendante du NO (Vlassara et Palace, 2002). En outre, des études in vitro ont révélé que les AGEs stimulent l'expression endothéliale des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et ELAM-1 via l'activation du NF-kB (Kunt et al., 1999; Renier et al., 2000).

Outre leur rôle pro-athérogénique via l'interaction des AGE à leur récepteur, la glycation de régions promotrices régulant des gènes impliqués dans le métabolisme du

glucose a été mis en évidence, contribuant ainsi aux complications diabétiques. À cet effet, il a été démontré que le promoteur du gène de l'insuline pouvait être glyqué en présence de D-ribose dans les cellules pancréatiques. Cette glycation provoque une diminution de l'activité du promoteur de l'insuline, affectant sa sécrétion et contribuant à la glucotoxicité des cellules  $\beta$  en milieu hyperglycémique (Matsuoka et al., 1997).

Les lipoprotéines telles les LDL et les VLDL peuvent aussi être glyquées. Cette modification les rend plus susceptibles à l'oxydation et plus athérogéniques (Vlassara et al., 2001). De manière intéressante, une corrélation positive a été notée chez les sujets diabétiques entre les niveaux de AGEs dans la paroi artérielle et ceux de LDL-AGE plasmatiques (Stitt et al., 1997). Ces LDL modifiées par glycation de l'apoprotéine B-100 ne pouvant plus se lier normalement à leur récepteur, le LDLR, restent ainsi de manière prolongée dans le plasma (Bucala et al., 1994; Bucala et al., 1995). Dans le même ordre d'idée, les molécules de HDL peuvent aussi être glyquées. Il a été rapporté que la glycation des HDL réduisait l'activité PON qui y est associée. Cette modification des HDL a pour effet de diminuer sa capacité à prévenir l'oxydation des LDL et l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire (Hedrick et al., 2000).

#### **1.1.7.4.3 Les récepteurs des AGEs**

**RAGE (récepteur des AGEs) :** Le RAGE a été purifié à partir des cellules endothéliales pulmonaires bovines, et est décrit comme une protéine de 35 kDa faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (Neeper et al., 1992). C'est maintenant un récepteur

reconnu des AGEs (Miyazaki et al., 2002). La liaison du AGE à son récepteur n'est pas suivie d'une endocytose du complexe mais induit plutôt une génération de signaux intracellulaires, incluant la production de ROS et une activation du NF- $\kappa$ B (Kislinger et al., 1999).

**SR-A** : Les AGEs, tout comme les autres ligands du SR-A, sont des molécules chargées négativement. Le groupe de Araki et coll. a voulu évalué si les AGEs étaient des ligands du SR-A en utilisant des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) qui surexprimaient le SR-A (Araki et al., 1995). Ils ont montré que les AGEs subissaient une endocytose suivie d'une dégradation lysosomale après leur liaison avec le SR-A. En accord avec ces résultats, il a été rapporté que des macrophages péritonéaux obtenus de souris déficientes en SR-A, présentaient une diminution de l'endocytose des AGEs comparativement à des macrophages de souris témoins (Suzuki et al., 1997).

**CD36** : Le CD36 est un récepteur glycosylé de 88 KDa ayant plusieurs ligands reconnus comme les acides gras, le collagène, la thrombospondine et les LDL oxydées (Febbraio et al., 2001). Le CD36 peut jouer un rôle pathophysiologique, entre autre au niveau du macrophage, où il lie les LDL oxydées et favorise la formation des cellules spumeuses. Il a aussi été démontré que le CD36 est exprimé dans les lésions athéromateuses humaines (Nakata et al., 1999). Avec le même type de protocole expérimental que pour le SR-A, il a été démontré récemment que le CD36 surexprimé par des cellules CHO était un récepteur des AGEs (Ohgami et al., 2001a).

**Récepteur scavenger-B1 (SR-B1)** : Le SR-B1 reconnaît les HDL et médie une captation sélective des esters de cholestérol, c'est-à-dire sans endocytose de la lipoprotéine complète

(Acton et al., 1996). Ce récepteur accélère le transport inverse du cholestérol en favorisant l'efflux de cholestérol des cellules périphériques, incluant le macrophage dans la paroi vasculaire, et la captation sélective des esters de cholestérol par les hépatocytes pour l'élimination ultérieure du cholestérol via la sécrétion de sels biliaires. Le SR-BI joue donc un rôle crucial dans le transport inverse du cholestérol et les effets anti-athérogéniques associés aux HDL. De manière intrigante, Ohgami et coll. a démontré que le SR-BI est un récepteur des AGEs (Ohgami et al., 2001b) mais que ces derniers ne compétitionnent pas avec les HDL pour la liaison à ce récepteur. Ces deux ligands semblent donc avoir des sites indépendants de liaison sur le récepteur. Par contre, les AGEs inhibent la captation des esters de cholestérol mais sans empêcher la liaison du HDL au SR-BI (Ohgami et al., 2001b). Le(s) mécanisme(s) sous-jacents à cet effet n'est (ne sont) pas encore connu(s) mais il a été proposé que le SR-BI forme un tunnel hydrophobe entre la particule HDL et la membrane cellulaire, permettant le transport des esters de cholestérol (Rodrigueza et al., 1999). Les AGEs interféreraient dans la formation de ce tunnel. Finalement, les AGEs inhibent aussi l'efflux du cholestérol vers les HDL. Ainsi, les AGEs, par ces deux mécanismes, préviennent le transport inverse du cholestérol.

## **I.2. DIABÈTE DE TYPE 2**

### **I.2.1 Définition**

Le diabète se définit comme un désordre chronique du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides, relatif à un déficit relatif ou absolu de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline. Il se caractérise par une hyperglycémie à jeun ou en période post-prandiale. Il existe deux types de diabète, à savoir le diabète de type 1 et 2. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune ciblant les cellules  $\beta$  du pancréas et induisant une perte de sécrétion d'insuline par cet organe. Le diabète de type 1 affecte environ 5 à 10% des sujets diabétiques tandis que 90 à 95% des cas de diabète sont de type 2. Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle présentant une composante génétique et environnementale. Le développement de la maladie peut être divisé en trois grands stades. Le premier stade est celui de l'IR accompagnée d'une hyperinsulinémie compensatrice visant à contrecarrer l'effet de la diminution de la sensibilité à l'insuline. À cette phase fait suite un état d'intolérance au glucose caractérisé par une augmentation des niveaux plasmatiques de glucose, mesurés par un test de tolérance au glucose, supérieurs aux niveaux normaux mais inférieurs à ceux retrouvés chez les sujets diabétiques. Cet état représente une étape transitoire vers le développement du diabète dû à une perte progressive de la capacité sécrétoire en insuline du pancréas. Enfin, survient un état insulino-pénique, s'aggravant graduellement au cours de l'évolution du diabète et causé par divers défauts des cellules  $\beta$  avec anomalie qualitative et quantitative de la sécrétion d'insuline. À ce stade, on assiste à l'apparition d'une hyperglycémie à jeun, la caractéristique clinique du diabète franc par excellence.

### **I.2.2 Diagnostic**

Le début de la maladie est souvent insidieux et peu symptomatique, ce qui complique grandement son diagnostic. Selon l’OMS, il est estimé que près de la moitié des diabétiques ignorent leur état. Il n’est donc pas rare que des diabétiques nouvellement diagnostiqués présentent déjà des complications vasculaires (Harris, 1999). Depuis 1997, année où l’association américaine du diabète a révisé les critères diagnostics de la maladie, il a été proposé que le diabète soit défini de la façon suivante :

-glycémie à jeun supérieure ou égale à 7 mmol/L,

-glycémie deux heures après l’ingestion de 75 g de glucose supérieure ou égale à 11 mmol/L.

Lorsque la glycémie à jeun est inférieure à 7 mmol/L mais qu’un test d’hyperglycémie provoquée démontre une glycémie supérieure à 11 mmol/L, on parlera alors d’état d’intolérance au glucose.

### **I.2.3 Prévalence**

Le diabète affecte environ 100 millions de personnes à travers le monde (Amos et al., 1997) et on estime que ce chiffre s’élèvera à 250 millions en 2020 (Perseghin et al., 2003). Il est maintenant reconnu que l’augmentation de l’incidence du diabète de type 2 de par le monde est une conséquence d’un style de vie sédentaire contribuant à l’augmentation

massive de l'incidence de l'obésité. Le diabète est associé à une augmentation de 2 à 8 fois de la prévalence, de l'incidence et de la mortalité par MCV (Luscher et al., 2003). Même après correction pour les facteurs de risque traditionnels tels le tabagisme, l'hypertension ou l'hypercholestérolémie, la mortalité chez les sujets diabétiques reste plus élevée que chez les non-diabétiques (Harris, 1996). Ainsi, chez les patients diabétiques ayant déjà eu une maladie coronarienne, le taux de mortalité est de 45% en sept ans et de 75% en dix ans. La mortalité par attaques cérébrovasculaires est aussi deux fois plus importante chez les individus diabétiques (Luscher et al., 2003).

#### **I.2.4 Diabète de type 2 et facteurs de risque**

L'IR est retrouvée de manière constante chez les patients diabétiques de type 2 et peut être détectée de 10 à 20 ans avant l'apparition de l'hyperglycémie (Perseghin et al., 2003). Des études prospectives ont démontré que l'IR est le meilleur facteur prédictif d'apparition du diabète chez un individu (Lillioja et al., 1993). D'autres facteurs de risque du diabète comprennent l'âge, le sexe, l'histoire familiale, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'obésité et les dyslipidémies. Il est bien connu qu'un environnement métabolique néfaste, appelé le syndrome métabolique, accompagne souvent l'IR. Au cours des dernières années ont été inclus dans la définition de ce syndrome : l'intolérance au glucose, l'IR, l'obésité, l'hypertension, la dyslipidémie, l'hyperuricémie, les anomalies de la coagulation et l'inflammation (Das, 2002; Hansen, 1999). La prévalence du syndrome métabolique dans la population générale est d'environ 24% (Sowers, 2003). La prévalence

de l'IR augmente en corrélation avec le nombre d'anomalies métaboliques. Par exemple, l'IR est présente chez 43% des patients ayant une des composantes du syndrome métabolique mais est détectée chez 95% de ceux en présentant quatre (Greenberg, 2003). Ces données sont également alarmantes au Québec où récemment, le groupe de Després et coll. a rapporté, par le biais de la *Quebec Health Survey*, que 61% des québécois présentaient un profil métabolique altéré prédisposant au développement du diabète de type 2 et des MCV (Scarsella et Despres, 2003).

L'association entre l'IR et l'inflammation chronique pourrait expliquer la raison pour laquelle les sujets porteurs du syndrome métabolique sont à risque accru de développer un diabète et des MCV. Récemment, le rôle de l'inflammation comme facteur prédictif du diabète de type 2 a été mis en évidence. En effet, il a démontré que des niveaux élevés de PAI-1, de CRP et d'IL-6 prédisaient son développement. (Das, 2002; Festa et al., 2003; Haffner, 2003). De plus, il est à noter que le syndrome métabolique est associé à des niveaux élevés de marqueurs inflammatoires tels l'IL-6 et la CRP (Pickup et Crook, 1998; Pradhan et al., 2001). Récemment, l'étude IRAS (*Insulin Resistance Atherosclerosis Study*) a rapporté que l'IR, un paramètre important du syndrome métabolique, était associée à des niveaux élevés de CRP, de fibrinogène et de PAI-1. Ceci supporte l'idée que l'inflammation puisse contribuer à l'IR et l'aggraver. Hotamisligil et coll. ont montré que le  $TNF\alpha$  pouvait interférer avec la voie de signalisation de l'insuline (Hotamisligil et al., 1994b). Il a aussi été démontré qu'une administration d'IL-6 chez l'humain induisait une augmentation de la néoglucogénèse, une hyperglycémie et une hyperinsulinémie compensatrice, tous des aspects de l'IR (Stith et Luo, 1994).

Inversement, l'IR pourrait contribuer à l'inflammation. En effet, il a été suggéré qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline pourrait induire la production de CRP en neutralisant l'effet inhibiteur de l'insuline sur sa synthèse hépatique (Festa et al., 2000). Le rôle crucial de l'IR et de l'inflammation comme facteurs étiologiques du syndrome métabolique démontrent l'importance des interactions entre ces états dans le développement du diabète de type 2 et des MCV.

### **I.2.5 Complications microvasculaires du diabète de type 2.**

Le diabète peut causer diverses complications microvasculaires incluant la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. Le principal mécanisme de développement des complications microvasculaires est l'effet toxique prolongé de l'hyperglycémie. Récemment, il a été démontré de manière convaincante par l'étude DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993*) (Wolffenbuttel, 1993) et l'étude UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study, 1998*), qu'un contrôle glycémique serré réduisait les complications microvasculaires diabétiques. Plus précisément, il a été rapporté qu'une réduction de 1% de l'hémoglobine glyquée s'accompagnait d'une diminution de 30% du risque de complications microvasculaires.

### **I.2.5.1 La rétinopathie**

La rétinopathie associée au diabète est la première cause de cécité chez l'adulte et est responsable de cette complication chez 57% des sujets diabétiques. Il est estimé qu'environ 20% des patients présentent déjà une rétinopathie diabétique au moment du diagnostic de la maladie (Bate et Jerums, 2003). Parmi les sujets atteints de diabète de type 2 depuis 20 ans, 80% présentent un certain degré de rétinopathie alors que 20% démontrent des lésions rétinienne prolifératives (Klein et al., 1995). À son stade précoce, la rétinopathie diabétique se caractérise par un œdème rétinien, conséquence d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Elle évolue vers une ischémie rétinienne et une prolifération capillaire, caractéristiques de la rétinopathie proliférative (Bate et Jerums, 2003).

### **I.2.5.2 La néphropathie**

La néphropathie diabétique est la première cause d'insuffisance rénale en Amérique du Nord (Bate et Jerums, 2003). La mortalité des patients diabétiques atteints de néphropathie est de 20 à 40 fois plus élevée que celle documentée chez les sujets qui en sont exempts. Elle évolue par phases distinctes et interreliées. La néphropathie est définie cliniquement par une protéinurie persistante associée à une hypertension et à une vitesse de filtration glomérulaire réduite (Bate et Jerums, 2003). Le signe le plus précoce de cette complication est l'apparition d'une microalbuminurie, un facteur de risque indépendant des MCV (Lane, 2004).

### **I.2.5.3 La neuropathie**

La neuropathie diabétique regroupe toute une série d'affections touchant les nerfs périphériques moteurs, sensoriels et autonomes. Elle cause une diminution de sensibilité cutanée et coexiste avec un syndrome d'insuffisance vasculaire à l'origine du "foot syndrome", une complication sévère pouvant conduire à l'amputation (Bate et Jerums, 2003). Ces altérations peuvent être accompagnées d'infections des membres inférieurs et de septicémie (Coleman, 1997).

### **I.2.6 Complications macrovasculaires du diabète de type 2.**

Les complications macrovasculaires du diabète constituent la première cause de mortalité chez les diabétiques, causant 80% des décès. Des études cliniques et épidémiologiques ont rapporté que la mortalité des sujets diabétiques de type 2 par MCV est de 2 à 4 fois plus élevée que celle documentée dans la population générale (Gu et al., 1998; Luscher et al., 2003; Stamler et al., 1993b). La prévalence de la maladie vasculaire périphérique dans le diabète de type 2 est pour sa part de 22% (Howard, 1996).

L'étude la plus importante en terme de longévité et de nombre de cas répertoriés visant à évaluer l'effet d'un contrôle glycémique serré sur l'incidence des complications diabétiques est la UKPDS. Cette étude regroupait une cohorte de plus de 5000 sujets diabétiques et s'étalait sur une période de 20 ans. L'objectif principal de l'étude était de vérifier si un contrôle glycémique serré pouvait prévenir de manière significative les

complications micro et macrovasculaires associées au diabète de type 2. Cette étude a démontré qu'une amélioration du contrôle glycémique réduisait ces deux types de complications vasculaires, bien que la diminution des complications macrovasculaires ne soit pas statistiquement significative. Une réduction de 1% de l'hémoglobine glyquée s'accompagnait d'une diminution de 18% du risque d'IM et de 25% du risque de mortalité associé au diabète de type 2.

La pathogenèse des MCV dans le diabète est multifactorielle et peut être affectée par des anomalies métaboliques ou autres. Bien qu'il n'existe pas de consensus clair quant aux processus pathogéniques causant les MCV dans le diabète de type 2, plusieurs mécanismes ont été proposés dans les dernières années (tableau I). Le rôle de quelques-uns de ces facteurs dans le développement athéromateux a été décrit dans les sections précédentes et sont associés à l'état diabétique. Les autres seront discutés dans les sections suivantes.

---

**Tableau 1. Mécanismes pathophysiologiques contribuant aux MCV associées au diabète de type 2.**

---

- Dyslipidémies : LDL petites et denses, ↑ LDL oxydées, ↑TG, ↓HDL.
- État d'hypercoagulation : ↑ PAI-1, ↑ fibrinogène, hyperactivité plaquettaire.
- État pro-inflammatoire : ↑ CRP, ↑ TNF $\alpha$ .
- Stress oxydatif et glycoxydation
- Dysfonction endothéliale : ↓ NO
- Augmentation des AGL
- Hyperglycémie
- Hyperinsulinémie et IR
- Activation de la PKC

---

*Adapté de(Beckman et al., 2002b; Eckel et Krauss, 1998).*

### **I.2.7 Obésité, inflammation et IR.**

Plusieurs études ont documenté une relation inverse entre l'indice de masse corporelle (IMC), une mesure de l'obésité, et la sensibilité à l'insuline, suggérant une relation causale entre l'obésité et l'IR (Finegood, 2003). Les mécanismes par lesquels l'obésité accentue l'IR ne sont pas encore bien décrits mais incluent l'inflammation. En effet, il y a maintenant plusieurs évidences démontrant que l'obésité constitue un état inflammatoire. L'hypothèse selon laquelle le tissu adipeux est un organe sécrétoire endocrine et que les molécules de signalisation qu'il sécrète jouent un rôle majeur dans le développement de l'IR a été mise de l'avant dans le milieu des années 90 avec la

découverte de la leptine (Campfield, 1995). Les adipocytes sécrètent nombre de facteurs inflammatoires, nommés en l'occurrence des adipokines, incluant le  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-6. Plus récemment, il a été rapporté que la CRP est aussi exprimée par le tissu adipeux (Ouchi et al., 2003b). Il a été démontré que l'obésité était associée à des niveaux élevés de CRP, d'IL-6 et de  $\text{TNF}\alpha$  et qu'une perte pondérale induisait une diminution des niveaux plasmatiques de ces trois facteurs inflammatoires (Rattazzi et al., 2003). Comme mentionné précédemment, Hotamisligil et coll. ont démontré que le  $\text{TNF}\alpha$  pouvait interférer avec la voie de signalisation de l'insuline en induisant la phosphorylation de IRS-1 (Hotamisligil et al., 1994b). Il a été proposé que le  $\text{TNF}\alpha$  puisse inhiber l'action de l'insuline au niveau adipocytaire par des mécanismes autocrine et paracrine (Yudkin, 2003). En effet, le  $\text{TNF}\alpha$  circulant est lié en grande partie à des protéines sanguines et ses niveaux sont faibles, rendant peu probable un rôle endocrine important de cette cytokine (Hotamisligil et Spiegelman, 1994). À l'inverse, l'IL-6 pourrait agir comme une hormone et exercer un effet endocrine. Interférant elle aussi avec la voie de signalisation de l'insuline et du transport du glucose, l'IL-6 pourrait induire une IR dans divers tissus périphériques incluant le foie, le muscle et le tissu adipeux (Kanemaki et al., 1998). L'IL-6 est aussi un inducteur majeur de la synthèse hépatique de CRP (Yudkin, 2003), contribuant possiblement à la surexpression de cette molécule inflammatoire dans l'obésité.

Une autre adipokine récemment décrite est l'adiponectine, la protéine adipocytaire la plus abondante. Celle-ci est particulièrement intéressante car, même si elle est d'origine exclusivement adipocytaire, ses niveaux plasmatiques sont diminués dans des modèles expérimentaux d'obésité et de diabète de type 2 (Haluzik et al., 2004). L'importance de

son rôle a été mise en évidence par la démonstration que des souris déficientes en adiponectine présentent une IR et des niveaux plasmatiques élevés de  $\text{TNF}\alpha$ . De plus, il a été observé que des concentrations élevées d'adiponectine chez les souris induisaient une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Berg et al., 2001). De manière intéressante, il a aussi été rapporté qu'une injection d'adiponectine à des souris apoE  $-/-$  réduisait la formation des lésions athéromateuses (Okamoto et al., 2002).

Ces observations ont été corroborées chez l'humain où l'adiponectine est retrouvée à des niveaux diminués chez les sujets obèses et diabétiques (Hotta et al., 2000; Stefan et al., 2002). De manière importante, les niveaux de cette protéine sont encore plus faibles chez les sujets diabétiques avec MCV. Les niveaux d'adiponectine corrént avec divers marqueurs d'IR (Hotta et al., 2000; Weyer et al., 2001). L'adiponectine semble aussi avoir des effets anti-inflammatoires. En effet, elle est inversement corrélée avec divers marqueurs inflammatoires tels la CRP, l'IL-6 et le  $\text{TNF}\alpha$  (Ouchi et al., 2003b) et inhibe la production de  $\text{TNF}\alpha$  par le tissu adipeux. L'amélioration de la sensibilité à l'insuline par la prise de thiazolidinediones chez des sujets obèses et diabétiques de type 2 est accompagnée d'une augmentation des niveaux d'adiponectine circulants (Maeda et al., 2001). Mises ensemble, ces études suggèrent un rôle protecteur de cette adipokine dans la pathogénèse de l'obésité, de l'inflammation, de l'IR et de l'athérosclérose (Haluzik et al., 2004).

Diverses études cliniques appuient le concept selon lequel l'IR et l'inflammation sont interreliées et qu'une amélioration d'un de ces paramètres a des effets bénéfiques sur l'autre. Un bon exemple provient de l'utilisation des thiazolidinediones, des agents

améliorant la sensibilité à l'insuline chez les diabétiques de type 2, et possédant des effets anti-inflammatoires (Garg et al., 2003). Il a été rapporté qu'un traitement à la rosiglitazone réduisait les niveaux de CRP chez des sujets diabétiques de type 2 (Haffner et al., 2002). Comme les thiazolidinediones, il a été suggéré que la metformine, un agent souvent utilisé dans le traitement du diabète de type 2, inhibant la production hépatique de glucose et améliorant la captation et le métabolisme du glucose par les muscles squelettiques, puisse avoir des propriétés anti-inflammatoires (Henry, 2003). Cette hypothèse est appuyée par l'observation que la metformine diminue la production d'IL-8 adipocytaire et les niveaux de CRP circulants chez les sujets diabétiques (Akbar, 2003; Bruun et al., 2000).

### **I.2.8 Obésité, acides gras libres (AGL) et IR**

Les patients obèses présentant des niveaux sériques élevés d'AGL ont une susceptibilité accrue à l'IR, bien que les mécanismes exacts de cette observation ne soient pas totalement clairs. Il semble qu'une altération de la répartition des graisses entre les différents tissus soit en cause.

L'hypothèse initiale proposée par Randle pour expliquer l'association positive entre des niveaux élevés d'AGL et l'IR était que les AGL entraînent en compétition avec le glucose pour leur utilisation comme substrat énergétique par les muscles. Randle suggérait que l'augmentation de l'oxydation des graisses par les muscles causait une IR (Randle et al., 1963). En effet, l'accumulation d'acides gras dans les cellules musculaires provoquait

une altération de la cascade de réactions enzymatiques prenant normalement place en présence de glucose et causait finalement une diminution de la captation du glucose sanguin (Perseghin et al., 2003).

Cette hypothèse a récemment été remise en question par le groupe de Perseghin et coll. Ces derniers ont en effet observé qu'une infusion d'AGL causait une réduction de 50% de la synthèse de glycogène musculaire et de l'oxydation du glucose contrairement à l'hypothèse de Randle. Cette diminution de synthèse du glycogène était précédée d'une chute de glucose-6-phosphate intracellulaire. Ces résultats suggéraient que l'accumulation d'AGL plasmatiques, telle qu'observée chez les sujets obèses, induisait initialement une IR en inhibant le transport ou la phosphorylation du glucose, suivie d'une réduction de la synthèse de glycogène et de l'oxydation du glucose (Perseghin et al., 2003).

Le nouveau modèle proposé actuellement (voir figure 5), en accord avec l'étude de Kim et coll. (Kim et al., 2001), est que l'augmentation des métabolites intracellulaires d'acides gras (diacylglycérol-DAG, acyl CoA etc..) active, via des voies de signalisation Jun NH<sub>2</sub> kinase terminale (JNK) et PKC dépendantes, une cascade de sérine/thréonine kinase (figure 5). La phosphorylation des serine/thréonine présentes dans l'IRS-1/2 inhibe l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-K) (Perseghin et al., 2003) et induit une diminution du transport du glucose (figure 5). Si cette hypothèse s'avérait vraie, n'importe quelle perturbation provoquant une accumulation d'acyl CoA intracellulaire dans le muscle ou le foie, pourrait induire une IR.

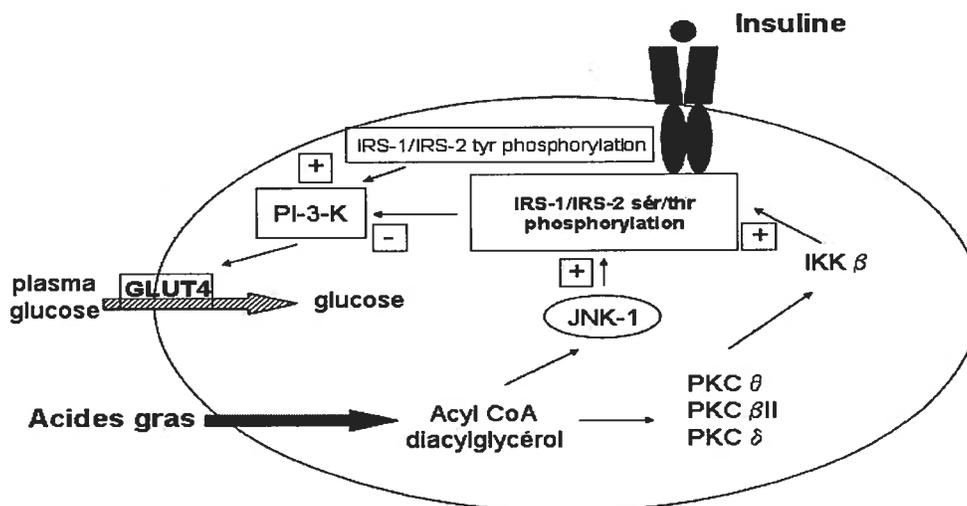


Figure 5. Mécanismes potentiels par lesquels les AGL induisent l'IR dans le muscle.

Cette hypothèse a l'avantage d'unifier diverses formes d'IR. En effet, elle fournit une explication au fait que les sujets lipodystrophiques, i.e. n'ayant peu ou pas de tissu adipeux, présentent aussi une IR. Récemment, une étude utilisant des souris transgéniques A-ZIP/F1, presque totalement dépourvues de tissu adipeux et présentant une IR, a pu démontrer chez ces animaux une déficience dans l'action de l'insuline, particulièrement au niveau de l'activation de la PI-3-K dépendante du IRS-1 dans le muscle et le foie. Ces anomalies étaient associées à une augmentation de l'ordre de deux fois des niveaux de TG dans le muscle et le foie. Ces derniers étaient normalisés par une transplantation de tissu adipeux chez ces souris, tout comme l'étaient la signalisation et l'action de l'insuline. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle l'IR se développe dans l'obésité, le diabète et la lipodystrophie en raison d'altérations de la partition des graisses entre le tissu adipeux et

les muscles ou le foie. La LPL est une enzyme clé du métabolisme lipidique et joue un rôle primordial dans la captation des lipides par les différents tissus. La captation des lipides par les tissus repose, entre autre, sur la balance entre les niveaux d'expression de la LPL musculaire et adipocytaire. Par exemple, en présence d'un ratio LPL adipocytaire/musculaire bas, ce qui est le cas dans l'obésité, une captation préférentielle des lipides par le muscle sera observée (Kern, 1997). Cette hypothèse a été nommée *substrate steal* et a récemment été vérifiée dans un modèle de souris surexprimant la LPL musculaire et démontrant une IR dans ce tissu (Kim et al., 2001).

L'augmentation des niveaux sanguins d'AGL contribue aussi à une lipotoxicité des cellules  $\beta$  du pancréas, empêchant leur fonction physiologique normale (Wyne, 2003). L'accumulation d'AGL dans les îlots de Langerhans entraîne une augmentation de la synthèse de céramide provenant de la condensation du palmitoyl-CoA avec la sérine. Le céramide stimule la production de NO via l'augmentation de l'expression de iNOS, et déclenche l'apoptose des cellules (Girard, 2003). Il en découle une diminution de la sécrétion d'insuline favorisant l'apparition du diabète de type 2.

### **I.2.9 Dysfonction endothéliale et l'IR dans le diabète de type 2**

Des études cliniques à long terme ont démontré que la dysfonction endothéliale était un facteur prédictif de l'athérosclérose (Gonzalez et Selwyn, 2003) et était indépendamment associée à un risque accru d'événements cardiovasculaires incluant l'IM

et l'accident cérébrovasculaire (Lyon et al., 2003). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que des thérapies réduisant la dysfonction endothéliale amenuisaient les conséquences cliniques des MCV (Gonzalez et Selwyn, 2003). La dysfonction endothéliale, un événement précoce du processus athéromateux, est documentée dans l'IR et prédit le développement du diabète de type 2 et de l'athérosclérose accélérée qui y est associée (figure 6). Un argument appuyant le concept selon lequel la dysfonction endothéliale est un facteur pathogénique important dans le développement du diabète est que l'exercice physique et la perte de poids, qui améliorent la fonction endothéliale, préviennent le diabète (Brendle et al., 2001; Clarkson et al., 1999; Knowler et al., 2002).

Il a été démontré, autant dans des modèles expérimentaux que chez l'humain, que le diabète était associé à une diminution de la biodisponibilité du NO (Kern et al., 1987). Les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale dans le diabète de type 2 incluent l'hyperglycémie, un excès d'AGL et la formation des AGEs (King, 1996). L'hyperglycémie provoque une élévation des niveaux de ROS médiée par l'activation de la NADPH oxydase et/ou de la PKC (King, 1996). Ces ROS inactivent le NO en formant du peroxy-nitrite (Beckman, 2001; Nishikawa et al., 2000). Les AGL influencent la vasodilatation dépendante de l'endothélium en réduisant les niveaux plasmatiques de plusieurs acides aminés, incluant la L-arginine, le substrat de eNOS (Ferrannini et al., 1986). De plus, une inhibition directe du eNOS par les AGL a été rapportée (Davda et al., 1995). De manière similaire, les AGEs interfèrent avec l'enzyme eNOS (Vlassara et Palace, 2002) et stimulent l'expression endothéliale des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et ELAM-1 via l'activation du NF- $\kappa$ B (Kunt et al., 1999; Renier et al., 2000).

Tel que mentionné précédemment, l'IR est associé à un état de dysfonction endothéliale (Pinkney et al., 1997). Ceci peut s'expliquer sur le plan moléculaire par le fait que l'IR s'accompagne d'un défaut de l'activation de la PI-3-K dont dépend la production du NO par les cellules endothéliales (Baron, 1999). Cette association peut aussi être expliquée par le fait que l'insuline est un stimulant de l'activité de eNOS (Steinberg et al., 1996). Si l'IR au niveau endothélial accentue la dysfonction endothéliale (Wyne, 2003), celle-ci semble aussi contribuer à l'état d'IR. Appuyant cette notion, une étude a rapporté qu'une infusion d'un inhibiteur de eNOS diminuait la captation du glucose par l'insuline (Baron et al., 1995).

S'il semble donc que l'IR et la dysfonction endothéliale soient interreliées, il apparaît aussi que l'inflammation puisse agir comme lien mécanistique entre ces deux états (figure 6) (Lyon et al., 2003). En accord avec cette hypothèse, une corrélation positive a été rapportée entre les niveaux de CRP et l'état de dysfonction endothéliale (Fichtlscherer et al., 2000; Fichtlscherer et Zeiher, 2000) ainsi qu'avec divers marqueurs de la dysfonction endothéliale, incluant le facteur von Willebrand et VCAM-1 (Schalkwijk et al., 1999). La CRP pourrait induire la dysfonction endothéliale de manière directe en inhibant l'expression et la bioactivité du eNOS (Venugopal et al., 2002b). À l'inverse, en exprimant différentes molécules d'adhésion dont VCAM-1, ICAM-1 et ELAM-1 permettant l'adhésion des monocytes à l'endothélium et leur migration sous la paroi vasculaire (Calles-Escandon et Cipolla, 2001) (figure 6), l'endothélium joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. Ce lien entre l'IR, l'inflammation et la dysfonction endothéliale est aussi bien mis en évidence par le fait que les thiazolidinediones diminuent les niveaux de CRP

(Haffner et al., 2002), de TNF $\alpha$  (Katsuki et al., 2000) et améliorent la fonction endothéliale (Kotchen et al., 1997; Walker et al., 1999; Watanabe et al., 2000). Le fait que la perte de poids et l'exercice physique améliorent la fonction endothéliale et préviennent le diabète souligne l'association forte entre la diminution de la sécrétion d'adipokines, la fonction endothéliale et la prévention du diabète de type 2 (Lyon et al., 2003).

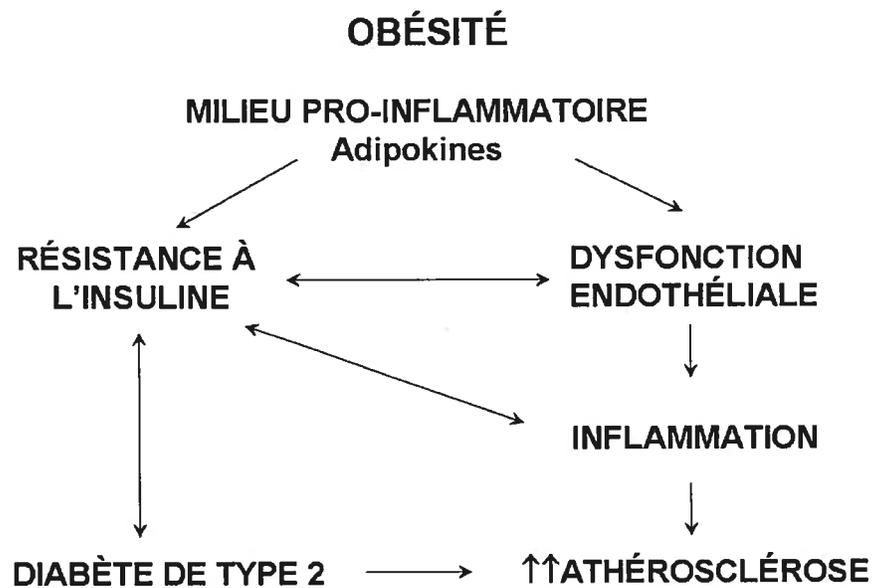


Figure 6. L'obésité favorise la progression parallèle de l'IR au diabète de type 2 et de la dysfonction endothéliale à l'athérosclérose (adapté de Lyon et al., 2003).

### **I.3. LIPOPROTÉINE LIPASE**

La LPL est une enzyme clé du métabolisme lipidique. Elle est principalement synthétisée par le tissu adipeux et les muscles cardiaques et squelettiques pour être ensuite liée aux héparans sulfate protéoglycans (HSPG) à la surface des cellules endothéliales des capillaires. La LPL hydrolyse les TG des chylomicrons et des VLDL circulantes. Les acides gras générés par cette action sont captés par les tissus périphériques incluant les muscles et le tissu adipeux. Le muscle catabolise les acides gras générés par la LPL pour fournir de l'énergie tandis que le tissu adipeux va emmagasiner ces acides gras. La LPL est aussi exprimée dans d'autres organes incluant le système nerveux, le cœur, le foie, les surrénales, les macrophages, les tubes proximaux des reins, les cellules pancréatiques et les poumons. La LPL semble avoir des rôles spécialisés dans ces différents organes. Par exemple, dans les poumons, la lipolyse médiée par la LPL est importante pour la production du *surfactant* (Merkel et al., 2002a).

#### **I.3.1 Synthèse, sécrétion et maturation de l'enzyme**

La LPL est composée de 448 acides aminés (Mead et Ramji, 2002). La traduction à partir de l'ARNm de la LPL s'effectue dans le réticulum endoplasmique (RE). La première modification post-transcriptionnelle de l'enzyme est sa glycosylation qui débute avec l'addition d'un oligosaccharide dans le RE. La protéine est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi où elle sera modifiée jusqu'à sa maturation complète, sous forme homodimérique. La nature du compartiment dans lequel la LPL se dimérise pour acquérir sa forme active, à savoir le RE ou le Golgi, fait toujours l'objet d'un débat. À sa sortie de

l'appareil *trans*-Golgi, la LPL est dirigée vers les vésicules sécrétoires. Elle sera ensuite soit transportée vers les lysosomes pour dégradation intracellulaire soit elle sera sécrétée. La LPL sécrétée sera alors transloquée à des sites HSPG fonctionnels à la surface luminale des cellules endothéliales des capillaires où elle jouera son rôle physiologique d'hydrolyse des TG des lipoprotéines circulantes (Mead et al., 2002). Pour être active, elle nécessite aussi un cofacteur, l'apoCII. La LPL mature contient environ 12% d'hydrates de carbone (Bensadoun, 1991). Certaines études suggèrent aussi que la LPL puisse être une glycoprotéine sulfatée. Cette sulfation, qui s'inscrit dans la régulation post-traductionnelle de l'enzyme, pourrait jouer un rôle dans l'ancrage de l'enzyme à la membrane plasmatique.

### **I.3.2 Organisation du gène de la LPL**

Le gène de la LPL a été étudié dans différentes espèces telles que le poulet, le bœuf, le cochon d'Inde, la souris, le rat et l'humain (Enerback et Gimble, 1993). Il a été localisé sur le chromosome 8. Le niveau de conservation du gène entre les mammifères est de 77-82%. L'homologie de la protéine entre les mammifères est de 90%. Pratiquement toutes les espèces ont conservé la triade catalytique composée de trois acides aminés, soit Ser-132, Asp-156 et His-241. Le gène de la LPL est constitué de 10 exons et 9 introns et la protéine est codée par les exons 1 à 9. L'exon 1 code pour la région 5'-non traduite où se situent les éléments de régulation de l'expression du gène de la LPL.

### I.3.2.1 Régulation transcriptionnelle de la LPL

Le promoteur du gène de la LPL contient une région 5'-régulatrice qui s'étend jusqu'à 4 kb du site d'initiation de la transcription. Les éléments *cis* qui s'y retrouvent sont résumés dans le tableau II. Les éléments de base du promoteur sont situés à 101 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription et se composent d'une boîte TATA où se lie le facteur de transcription IIB (TFIIB), nécessaire à l'initiation de la transcription, d'un motif octamer, où se lient le Oct-1 et Oct-2, et d'une boîte CCAAT, liant le facteur nucléaire-Y (NF-Y) responsable de la suppression de l'expression de la LPL en réponse au TNF $\alpha$ . Le groupe de Enerback et coll. a démontré que les motifs lipoprotéines  $\alpha$  et  $\beta$  (Lp $\alpha$  et Lp $\beta$ ) se lient au facteur nucléaire-3 (NF-3) (Enerback et Gimble, 1993). Cette interaction contribue à la différenciation durant l'adipogénèse. La différenciation est donc dépendante de l'activité du promoteur. Un élément CT affecte l'activité basale du promoteur de la LPL par la liaison de Sp1 et/ou Sp3 à ce site, deux facteurs de transcription contenant trois motifs à doigts de zinc. Chevauchant l'élément CT, l'élément régulé par les stéroïdes ou "*sterol regulatory element*" (SRE) est responsable de la réponse de la LPL aux stéroïdes. Le SREBP-1 et le Sp1 se lient à cette séquence de manière compétitive. Cette compétition entre ces deux facteurs de transcription pourrait être un mécanisme par lequel les métabolismes du cholestérol et des triglycérides s'autorégulent. Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 se lient aussi à l'élément de réponse de l'INF- $\gamma$ . En effet, lorsque les macrophages sont mis en présence d'INF- $\gamma$ , les niveaux de Sp3 diminuent ainsi que le niveau de transcription de la LPL. Un autre site qui a beaucoup attiré l'attention ces dernières années est l'élément de réponse aux PPARs (*peroxisome proliferator activated*

*receptor*). Caractérisé par Schoonjans et coll. (Schoonjans et al., 1996), cet élément, tel que son nom l'indique, est lié par les récepteurs nucléaires PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  et PPAR- $\gamma$ . Pour se lier au promoteur de la LPL, ces derniers forment des hétérodimères avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR). Il a été démontré que les niveaux d'ARNm et d'activité de la LPL étaient régulés de façon tissu-spécifique par les PPAR- $\alpha$  et  $\gamma$ . Encore plus récemment, un élément de réponse au LXR (*oxysterol liver X receptor*) a été identifié dans l'intron 1 du gène de la LPL murine. Cet élément de réponse semble responsable de l'induction, par une diète riche en cholestérol, de la LPL hépatique et macrophagique (Zhang et al., 2001a). Finalement, on retrouve un motif du facteur nucléaire-1 (NF-1), qui semble responsable de la suppression de l'expression génique de la LPL dans le foie au cours du développement, et un élément "*activated protein-1*" (AP-1), auquel se lient les hétérodimères *c-jun/c-fos* ou *c-jun/c-jun*, impliqués dans l'augmentation de l'expression du gène de la LPL en réponse au glucose (Enerback et Gimble, 1993; Sartippour et al., 1998).

Tableau II. Éléments de réponse présents dans le promoteur du gène de la LPL.

<i>Éléments de réponse</i>	<i>Position dans le promoteur</i>
ATTGTCAT	-46
Boîtes CCAAT	-65 à -61, -505 à -501
Sites Oct-1	-186 à -179, -589 à -582
LP- $\alpha$	-702 à -666
LP- $\beta$	-468 à -430
Élément CT	-91 à -83
SRE	-90 à -81
INF- $\gamma$ RE	-31 à +187
CRE-like	-372 à -367
FSE2-like	-362 à -355, -206 à -200
TRE	+22 à +29
GRE	-1543 à -1538, -1272 à -1267, -881 à -876, -777 à -772, -645 à -640
AP-1	-1946 à -1940
NF-1	-514 à -487
PPRE	-169 à -157
LXR	+635 à +650

Adapté de (Enerback et Gimble, 1993; Mead et al., 2002; Merkel et al., 2002a; Preiss-Landl et al., 2002).

### I.3.3 Régulateurs physiologiques de la LPL

#### I.3.3.1 L'état de jeûne, l'état post-prandial et l'exercice physique

La régulation de la LPL monocytaire/macrophagique dans les états de jeûne et post-prandial n'est pas documentée dans la littérature. Par contre, il est maintenant bien connu que la LPL du tissu adipeux et la LPL musculaire sont inversement régulées en état post-prandial ou en état de jeûne. En effet, la LPL adipocytaire augmente après un repas tandis que la LPL musculaire diminue et inversement en état de jeûne (Eckel, 1989), (Olivecrona et al., 1995). Ainsi, on maximise le stockage d'énergie pendant le repas et on rend

accessible l'énergie par les muscles entre ceux-ci. De la même manière, suite à un exercice physique, la LPL musculaire augmente, favorisant l'utilisation énergétique. On a d'ailleurs pu démontrer chez des athlètes ayant cessé de s'entraîner pour une période de 2 semaines, une diminution de la LPL musculaire et une augmentation de la LPL adipocytaire (Simsolo et al., 1993). De façon similaire, une augmentation de la LPL adipocytaire a été documentée chez des rats n'ayant plus recours à l'exercice pour une période de 2 semaines (Lambert et al., 1994).

### **I.3.3.2 Régulation hormonale**

Une quantité phénoménale d'études sont répertoriées dans la littérature concernant la régulation hormonale de la LPL.

#### **I.3.3.2.1 Hormone de croissance**

Il a été démontré que l'hormone de croissance (GH) diminuait l'activité de la LPL adipocytaire in vitro. Quant au facteur de croissance de l'insuline (IGF-1), il a été démontré qu'il diminuait l'activité de la LPL dans le tissu adipeux sans toutefois moduler l'activité de la LPL musculaire (Oscarsson et al., 1999) En accord avec ces résultats in vitro, il a été rapporté que la GH inhibe la LPL adipocytaire in vivo et ce faisant, diminue l'adiposité et l'accumulation de TG (Nam et Marcus, 2000; Takahashi et Satozawa, 2002), suggérant un rôle important de la LPL dans le développement de l'obésité. À l'inverse,

l'administration de GH chez des personnes déficientes en GH et non obèses induit une augmentation de l'expression de la LPL autant dans le tissu adipeux que dans le muscle (Khalfallah et al., 2001). Chez des rats hypophysectomisés, un traitement à la GH stimule l'activité de la LPL musculaire et cardiaque mais a peu d'effet sur la LPL adipocytaire (Oscarsson et al., 1999).

À ce jour, une seule étude a évalué la régulation de la LPL macrophagique en relation avec la GH (Serri et al., 2004). Il a été rapporté que l'expression génique, la masse et l'activité de la LPL macrophagique est augmentée chez des patients déficients en GH. Les macrophages isolés de ces patients démontrent aussi une augmentation de la captation de lipoprotéines athérogéniques et sont plus susceptibles d'être transformés en cellules spumeuses. De manière intéressante, l'ajout d'IGF-1 dans le milieu de culture de ces macrophages diminue l'augmentation de la sécrétion de la LPL par ces cellules. Il a été suggéré que ces altérations pourraient contribuer au développement accéléré d'athérosclérose observé chez les patients déficients en GH.

#### **I.3.3.2.2 Insuline**

Dans la plupart des études, il a été démontré que l'activité de la LPL adipocytaire augmentait avec les niveaux d'insuline sérique et le degré de sensibilité à l'insuline. Diverses études in vitro ont pu démontrer que l'insuline augmentait l'activité de la LPL adipocytaire (Kern et al., 1988; McTernan et al., 2002a; McTernan et al., 2002b; Ong et al., 1988b; Ong et al., 1988a; Semenkovich et al., 1989) . Un effet synergique a été observé entre l'insuline et les glucocorticoïdes pour l'augmentation de l'activité de la LPL

adipocytaire (Fried et al., 1993). À l'inverse, l'administration d'insuline semble diminuer les niveaux d'ARNm de la LPL au niveau musculaire (Laville et al., 1996). Une autre étude a rapporté qu'une infusion de glucose/insuline diminuait l'activité de la LPL des muscles squelettiques chez des sujets normaux, un peu comme dans un état post-prandial. Quelques études ont vérifié l'effet de l'insuline sur l'expression de la LPL macrophagique. D'abord, le groupe de Behr SR et coll. a démontré que l'insuline, l'IGF-1 et la L-thyroxine n'avaient aucun effet sur la sécrétion de la LPL par les macrophages J774 (Behr et Kraemer, 1986a). Ces résultats ont été confirmés par un autre groupe (Kawakami et al., 1986). Il est intéressant de souligner qu'une diminution de 70% de la sécrétion de LPL macrophagique a été notée chez des souris déficientes en insuline (Behr et Kraemer, 1988). Toutefois, lorsque ces macrophages sont traités avec de l'insuline in vitro, aucune modulation de la sécrétion de LPL n'est observée. Ceci suggère que l'insuline n'a pas d'effet direct sur la sécrétion de la LPL macrophagique.

#### **I.3.3.2.3 Les glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes sont aussi de puissants régulateurs de la LPL. Il a été démontré que la dexaméthasone stimule l'ARNm et l'activité de la LPL adipocytaire ex vivo (Fried et al., 1993). Chez des patients souffrant du syndrome de Cushing, où on retrouve des niveaux élevés de cortisol sérique, une augmentation de l'activité de la LPL adipocytaire est constatée (McCarty, 2001). Contrairement à la LPL adipocytaire, il a été démontré que le dexaméthasone diminuait la sécrétion de la LPL macrophagique in vitro (Kawakami et al., 1986). À noter cependant qu'une augmentation de l'ARNm et de la

masse de la LPL produite par des macrophages THP-1 ou des macrophages dérivés de monocytes humains incubés en présence de dexaméthasone a été rapportée quelques années plus tard (Domin et al., 1991).

#### **I.3.3.2.4 Leptine**

La leptine est une hormone sécrétée exclusivement par les adipocytes et un puissant régulateur de l'appétit. Elle est surexprimée dans l'obésité mais son organe cible, l'hypothalamus, semble résistant à son effet. Quelques études se sont attardées à vérifier l'effet de la leptine sur l'expression de la LPL. Il semble que la leptine augmente légèrement ou n'affecte pas la LPL adipocytaire (Machinal-Quelin et al., 2002; Ranganathan et al., 1998). Une étude réalisée in vivo chez les souris ob/ob, déficientes en leptine, a démontré que l'injection de leptine diminuait l'activité de la LPL adipocytaire. Cependant, cet effet semblait secondaire à l'atténuation de l'hyperinsulinémie en réponse à la leptine (Picard et al., 1998). Plus récemment, il a été établi que la leptine stimulait in vitro l'expression de la LPL macrophagique (Maingrette et coll., 2003).

#### **I.3.3.2.5 Les hormones sexuelles**

Les hormones sexuelles telles que la testostérone et les estrogènes peuvent influencer l'expression de la LPL. À cet effet, une corrélation négative est observée entre les niveaux d'estrogènes et l'activité de la LPL adipocytaire chez les femmes obèses préménopausées (Iverius et Brunzell, 1988). Une étude in vitro a rapporté une diminution

de l'activité de la LPL adipocytaire en présence d'oestrogènes et un site spécifique de réponse aux oestrogènes dans le promoteur du gène de la LPL (Homma et al., 2000). À ma connaissance, une seule étude a évalué l'effet des estrogènes sur l'activité de la LPL macrophagique (Napolitano et al., 2001). Cette étude a démontré que les estrogènes augmentaient l'activité de la LPL par les macrophages chargés de lipides.

Chez l'homme, la testostérone semble aussi avoir un effet bénéfique sur l'adiposité. En effet, il a été démontré que la testostérone diminue l'activité de la LPL adipocytaire, surtout au niveau du tissu adipeux viscéral (De Pergola, 2000; Marin, 1995; Rebuffe-Scrive et al., 1991). La diminution des niveaux de testostérone avec l'âge pourrait contribuer à une augmentation de la LPL adipocytaire et conséquemment, à l'apparition de l'obésité.

### **I.3.3.3 Les cytokines pro-inflammatoires**

#### **I.3.3.3.1 TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  inhibe l'activité de la LPL adipocytaire de manière dose- et temps-dépendant in vitro (Price et al., 1986) et, chez l'humain, une forte corrélation négative existe entre les niveaux adipocytaires de TNF $\alpha$  et de LPL (Bullo et al., 2002; Kern et al., 1995). La régulation de la LPL macrophagique par le TNF $\alpha$  a aussi été étudiée. Utilisant des cellules macrophagiques murines J774.2, Tengku-Muhammad TS et coll. ont démontré que le TNF $\alpha$  diminuait de manière dose et temps dépendant l'expression génique et l'activité de la LPL d'environ 80% (Tengku-Muhammad et al., 1996). La suppression de l'activité de la LPL était plus importante quand l'IL-11 était combinée au TNF $\alpha$  (Tengku-

Muhammad et al., 1996). Un effet inhibiteur synergistique a aussi été observé lorsque les macrophages étaient co-incubés en présence d'INF- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (Tengku-Muhammad et al., 1998), l'effet étant maximal lorsque les cellules étaient d'abord traitées par l'INF- $\gamma$ .

#### **I.3.3.3.2 Interleukine-1 (IL-1)**

L'IL-1 inhibe l'expression génique, la masse et l'activité de la LPL adipocytaire. Alors que cette cytokine ne semble avoir aucun effet sur la LPL sécrétée par des macrophages dérivés de monocytes (MDMs) humains (Enerback et Gimble, 1993), Tengku-Muhammad TS et coll. ont démontré que l'IL-1 diminue les niveaux d'ARNm et d'activité de la LPL macrophagique murine (Querfeld et al., 1990; Tengku-Muhammad et al., 1996) par l'activation d'une tyrosine kinase (Tengku-Muhammad et al., 1999).

#### **I.3.3.3.3 INF- $\gamma$**

L'INF- $\gamma$  inhibe l'activité de la LPL adipocytaire d'environ 80% (Enerback et Gimble, 1993). Comme mentionné ci-haut, l'INF- $\gamma$  synergise avec le TNF $\alpha$  pour inhiber l'expression de la LPL adipocytaire. De manière similaire, un effet inhibiteur de l'INF- $\gamma$  a été démontré au niveau de l'ARNm, de la masse et de l'activité de la LPL macrophagique humaine (Querfeld et al., 1990; Tengku-Muhammad et al., 1996).

#### **I.3.3.3.4 IL-6**

L'administration d'IL-6 à des souris induit une baisse de 50% de l'activité de la LPL du tissu adipeux. Ces résultats sont comparables à ceux générés in vitro avec des adipocytes murins 3T3-L1 (Enerback et Gimble, 1993). Néanmoins, l'IL-6 ne semble pas affecter les niveaux d'ARNm ou l'activité de la LPL macrophagique (Tengku-Muhammad et al., 1996).

#### **I.3.3.3.5 Lipopolysaccharide (LPS)**

Il a été démontré que la LPS diminue l'activité et l'expression génique de la LPL par des cellules adipocytaires 3T3-L1 (White et al., 1988). En outre, il est maintenant bien connu que la LPS diminue de 80 à 90% l'expression de la LPL macrophagique et ce, tant au niveau du gène, de la protéine et de l'activité de l'enzyme (Tengku-Muhammad et al., 1996).

Une liste exhaustive des régulateurs physiologiques de la LPL adipocytaire ou macrophagique est fournie dans le tableau III.

Tableau III. Régulateurs physiologiques de la LPL (Mead et al., 2002).

<i>Agent régulateur</i>	<i>Type cellulaire/tissulaire</i>	<i>Effet sur la LPL</i>
bFGF	Cellules cardiaques de rat	↑ mRNA, ↑ activité
Acides gras	Macrophages J774.2	↑ mRNA, ↑ activité
Glucose	Macrophages J774.2	↑ mRNA, ↑ activité
IFN- $\gamma$	3T3-F442A	↓ mRNA, ↓ activité
	3T3-L1	↓ activité
	J774.2	↓ mRNA, ↓ activité
	Macrophages humains	↓ activité
IL-1	3T3-F442A	↓ activité, ↔ mRNA
	3T3-L1	↓ mRNA, ↓ activité
	Macrophages humains	↓ activité
	Cellules cardiaques de rat	↓ activité, ↔ mRNA
IL-6	J774.2	↓ mRNA, ↓ activité
	3T3-L1	↓ activité
IL-11	Adipocytes murins	↓ activité
	3T3-L1	↓ activité
LPS	J774.2	↓ mRNA, ↓ activité
	3T3-L1	↔ mRNA
	Macrophages humains	↓ mRNA, ↓ activité
M-CSF	Macrophages murins dérivés de la moelle osseuse	↓ activité
	Cellules cardiaques de rat	↓ activité
	Macrophages humains	↑ mRNA, ↑ activité
	Macrophages humains	↓ mRNA, ↓ activité
LDL oxydées	Macrophages humains	↓ mRNA, ↓ activité
Oxystérols	Macrophages murins	↑ mRNA, ↑ activité
PDGF	Macrophages humains	↑ mRNA, ↑ activité
Prostaglandines	3T3-L1	↓ activité
	Adipocytes de rat	↓ mRNA, ↓ activité
	Macrophages murins péritonéaux	↓ mRNA, ↓ activité
Intermédiaires des radicalaires oxygénés	J774.2	↑ mRNA, ↑ activité
TGF- $\beta$	Cellules cardiaques de rat	↓ mRNA, ↓ activité
TNF- $\alpha$	3T3-F442A	↓ mRNA, ↓ activité
	3T3-L1	↓ mRNA, ↓ activité
	Adipocytes de rats	↓ mRNA, ↓ activité
	Macrophages murins péritonéaux	↓ activité
	J774.2	↓ mRNA, ↓ activité
	Cellules cardiaques de rat	↓ activité

### I.3.4 LPL et obésité

Comme la LPL joue un rôle prédominant dans le stockage des lipides dans le tissu adipeux, il est possible qu'elle soit impliquée dans le développement de l'obésité. De fait, Kern et coll. (Kern, 1997) ont démontré que l'activité de la LPL dans le tissu adipeux était augmentée chez des personnes obèses. La régulation de la LPL dans l'obésité est très complexe. L'obésité est associée à un mode de vie sédentaire et à un excès de l'apport calorique. Or, comme mentionné auparavant, la LPL adipocytaire et musculaire sont inversement régulées pendant l'état post-prandial et de jeûne. La LPL adipocytaire augmente après un repas tandis que la LPL musculaire diminue et inversement lors du jeûne (Eckel, 1989). Il semble plus pertinent de tenir compte de la balance entre l'activité de la LPL adipocytaire versus musculaire. Plus le ratio LPL adipocytaire/musculaire est élevé, plus les acides gras vont avoir tendance à être emmagasinés dans le tissu adipeux et ainsi contribuer à l'apparition de l'obésité. Ceci semble être confirmé par de récentes études (Mantha et al., 2002; Roberts et al., 2002) faites chez des animaux obèses qui ont montré une augmentation de la LPL adipocytaire et une diminution de la LPL musculaire en réponse à une diète riche en gras. Inversement, lorsque le ratio LPL adipocytaire/musculaire est faible, on peut supposer que la forte activité de la LPL musculaire puisse contrecarrer l'obésité. Cette hypothèse nommée *substrate steal* a pu être démontrée dans un modèle de souris transgénique surexprimant la LPL dans le muscle squelettique. Dans ce modèle, il a été démontré que la surexpression de LPL musculaire pouvait prévenir l'obésité induite par une diète riche en gras (Jensen et al., 1997). À l'inverse, il a été documenté que des animaux obèses génétiquement (*ob/ob*) ou soumis à

une diète riche en gras sont résistants au développement de l'obésité lorsqu'ils sont porteurs d'une déficience en LPL adipocytaire (Preiss-Landl et al., 2002; Weinstock et al., 1997). Le ratio LPL adipocytaire/musculaire est central dans le développement de l'obésité. C'est pourquoi les modèles animaux surexprimant la LPL de façon non tissu-spécifique ne développaient pas d'obésité, le ratio LPL adipocytaire/musculaire n'ayant pas changé (Shimada et al., 1995).

### **I.3.5 LPL et diabète de type 2**

Les premières études examinant l'expression de la LPL dans le diabète ont été réalisées chez des animaux rendus insulino-déficients par injection de streptozotocine. Au vu de la régulation de la LPL par l'insuline, il n'est pas surprenant de constater une diminution de la LPL adipocytaire dans ce modèle expérimental de diabète ainsi qu'une augmentation ou une absence de modulation de la LPL musculaire (Chen et al., 1980; Rauramaa et al., 1980). Chez ces rats, un traitement à l'insuline restaure l'activité de la LPL adipocytaire (Ranganathan et al., 2000; Tavangar et al., 1992). Chez l'humain, une régulation similaire de la LPL a été observée dans le diabète mal contrôlé (Pfeifer et al., 1983; Taskinen, 1987). Encore ici, une amélioration du contrôle glycémique par un traitement à l'insuline ou avec une médication permet de restaurer l'activité de la LPL adipocytaire (Simsolo et al., 1992). Le niveau d'expression de la LPL est ainsi en étroite relation avec le niveau d'insuline et la sensibilité à l'insuline. Une étude réalisée *in vitro* a évalué l'effet direct du glucose sur l'activité de la LPL dans des cultures primaires d'adipocytes humains. De manière intéressante, l'activité de la LPL était augmentée en

présence de faible concentration de glucose alors que l'inverse était observé en milieu hyperglycémique (Kern et al., 1987), suggérant que non seulement la modification de l'expression de l'insuline mais aussi les niveaux sériques de glucose chez les patients diabétiques mal contrôlés puissent contribuer à l'atténuation de l'activité de la LPL. Les AGL constituent un autre facteur retrouvé à des niveaux anormalement élevés chez les sujets diabétiques de type 2. Des études ont pu établir que l'activité de la LPL adipocytaire était augmentée en réponse à une diète riche en gras (Ong et Kern, 1989). Une étude *in vitro* a démontré une augmentation de l'expression génique de la LPL adipocytaire en réponse aux AGL mais avec une diminution de son activité (Amri et al., 1996). Une diète riche en acides gras provenant de l'huile de poisson, connue pour être anti-athérogénique, augmente les niveaux d'ARNm de la LPL adipocytaire chez le rat (Murphy et al., 1993). Une régulation parallèle de la LPL a été retrouvée chez des hommes diabétiques de type 2 recevant une supplémentation en acides gras n-3 par de l'huile de poisson (Luo et al., 1998). Il est maintenant connu que le promoteur du gène de la LPL contient un site de liaison aux PPARs, des récepteurs nucléaires ayant, entre autres, comme activateurs les thiazolidinediones (TZDs) et les acides gras (Schoonjans et al., 1996). La LPL peut donc être régulée par ces facteurs au niveau transcriptionnel. Il a été démontré que les TZDs, des ligands des PPARs utilisés pour augmenter la sensibilité à l'insuline chez les diabétiques, stimule l'expression de la LPL adipocytaire (McTernan et al., 2002b). Plus récemment, une corrélation positive a été notée entre l'expression de PPAR $\gamma$  et la LPL dans le muscle squelettique (Lapsys et al., 2000). Les auteurs proposent que les TZDs stimulent l'expression de la LPL musculaire via PPAR $\gamma$ , qui induit aussi l'expression d'autres gènes

impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Ces résultats suggèrent que les TZDs, en modulant le métabolisme lipidique, pourraient améliorer l'action de l'insuline directement dans les muscles. La régulation de la LPL macrophagique a aussi été étudiée dans le diabète de type 2 par notre groupe. Nous avons démontré que les macrophages dérivés de monocytes isolés de patients diabétiques de type 2 surexpriment la LPL (Sartippour et Renier, 2000). Il semble que des facteurs métaboliques altérés dans cette maladie, tels le glucose (Sartippour et al., 1998), les acides gras (Michaud et Renier, 2001) et la leptine (Maingrette et Renier, 2003), soient responsables, du moins en partie, de cet effet. De manière intéressante, une autre étude a rapporté des résultats différents des nôtres. Après avoir isolé des monocytes de sujets diabétiques de type 2 et les avoir différenciés en macrophages, les auteurs ont remarqué une diminution de l'expression génique et de l'activité de la LPL sécrétée par ces cellules (Dobrian et al., 2000). Il faut cependant souligner que ces cellules démontraient déjà, après 7 jours en culture, un phénotype de cellule spumeuse, ce qui pourrait expliquer la différence de régulation de la LPL.

### **I.3.6 La LPL et l'athérosclérose**

Un paradoxe existe quant à l'expression de la LPL et le développement de l'athérosclérose. En effet, la LPL produite par le tissu adipeux et les muscles squelettiques est anti-athérogénique tandis que la LPL exprimée au niveau de la paroi vasculaire, principalement par les macrophages, semble jouer un rôle pro-athérogénique.

### **I.3.6.1 Effets anti-athérogéniques de la LPL**

Il est maintenant bien établi qu'une lipolyse efficace des lipoprotéines riches en TG dans le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux génère un profil lipidique anti-athérogénique. De ce fait, il a été postulé que la LPL présente dans ces tissus puisse jouer un rôle anti-athérogénique. Diverses études cliniques ont démontré cet effet anti-athérogénique de la LPL. D'abord, il semble qu'une diminution de la production de la LPL adipocytaire soit, du moins en partie, responsable de l'hypertriglycéridémie associée à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2, deux facteurs de risque majeurs des MCV. Cette réduction de production de LPL adipocytaire pourrait être en relation avec l'augmentation de la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF $\alpha$ , observées dans ces conditions pathologiques (Kern, 1997). L'étude REGRESS a en outre démontré l'existence d'une corrélation inverse entre la sévérité de l'angine et les niveaux d'activité de la LPL post-héparine chez des hommes présentant une maladie coronarienne artérielle (Kastelein et al., 2000). Une autre étude clinique japonaise a aussi documenté des niveaux diminués de LPL sérique chez des patients démontrant des signes d'athérosclérose coronarienne (Hitsumoto et al., 2000). En outre, de nombreuses mutations identifiées dans le gène de la LPL ont été associées à des profils lipidiques pro-athérogéniques et à une augmentation des risques de MCV (Mead et al., 1999a; Mead et Ramji, 2002). Finalement, il a été démontré que les niveaux de HDL, connues pour être anti-athérogéniques, sont liés directement aux niveaux d'activité de la LPL plasmatique. Ainsi, un génotype hétérozygote de la LPL est associé à une diminution des HDLs chez l'humain (Mead et Ramji, 2002).

Plusieurs évidences du rôle anti-athérogénique de la LPL proviennent d'études réalisées sur des modèles animaux. Une étude de Clee et coll. a montré une réduction des lésions athéromateuses chez des souris transgéniques surproduisant la LPL plasmatique, mais conservant une expression de LPL macrophagique non altérée (Clee et al., 2000). Une autre étude a rapporté qu'une administration du composé NO-1886 chez le rat, un inducteur de l'activité de la LPL, protège de l'athérosclérose via une augmentation des niveaux de HDLs (Tsutsumi et al., 1993). Plus récemment et de manière intéressante, il a été rapporté que les statines, des agents hypolipémiants, augmentaient l'activité de la LPL dans le tissu adipeux et le cœur de rats, tout en diminuant l'apoCIII, un inhibiteur naturel de la LPL (Schoonjans et al., 1999).

### **I.3.6.2 Effets pro-athérogéniques de la LPL**

La LPL est sécrétée par les macrophages et les CML dans les lésions athéromateuses (Chait et al., 1982). Diverses études ont suggéré au cours des dernières décennies que la LPL produite par les macrophages dans la paroi artérielle puisse jouer un rôle pro-athérogénique. Tout d'abord, une corrélation positive a été rapportée entre l'activité de la LPL et la sévérité des lésions athérosclérotiques (Corey et Zilvermit, 1977). De plus, une étude par Renier et coll. a montré que des souris démontrant une susceptibilité accrue à l'athérosclérose surexprimaient la LPL macrophagique comparativement à des souris résistantes à cette maladie (Renier et al., 1993). Il a en outre aussi été démontré que la LPL induisait la production de cytokines proinflammatoires telles que le  $\text{TNF}\alpha$  (Renier

et al., 1994) et la prolifération des CMLs (Mamputu et al., 2000). De récentes études in vivo ont renforcé l'hypothèse d'un rôle pro-athérogénique de cette enzyme dans la paroi vasculaire. Ainsi, Semenkovich et coll. (Semenkovich et al., 1998) ont démontré que l'accentuation de la dyslipidémie chez des souris hétérozygotes déficientes en LPL (LPL +/-) soumises à une diète athérogénique, n'avait pas d'impact sur la sévérité des lésions athéromateuses, suggérant que les effets négatifs de la dyslipidémie sur le processus athéromateux soient contrebalancés par une diminution d'expression de la LPL dans la paroi vasculaire. Une autre étude réalisée par Babaev et coll. (Babaev et al., 1999) supporte aussi le concept du rôle pro-athérogénique de la LPL dans la paroi vasculaire. Ce groupe a utilisé des souris chimériques pour l'expression de la LPL macrophagique (LPL -/-, LPL +/-, LPL +/+) et après les avoir soumises à une diète athérogénique, a mesuré la surface des lésions athéromateuses. L'étude rapporte une diminution de la surface moyenne des lésions de 55% chez les souris LPL -/-, comparativement aux souris LPL +/+ et de 45% par rapport aux souris LPL +/- . Ces résultats démontrent donc que la LPL macrophagique contribue à la formation des cellules spumeuses et à l'athérosclérose in vivo. Ce groupe a utilisé la même approche expérimentale chez des souris présentant une déficience en récepteur aux LDL (Babaev et al., 2000). De manière similaire, les lésions étaient plus importantes chez les souris LPL +/+, LDLR -/- comparativement aux souris LPL -/-, LDLR -/-, suggérant une contribution importante de la LPL macrophagique dans le développement des lésions précoces riches en macrophages. Une étude récente réalisée par Van Eck M. et coll. (Van Eck et al., 2000) a été menée avec des souris chimériques n'exprimant pas la LPL dans les cellules dérivées de cellules souches transplantées, dont les monocytes et les

macrophages (souris LPL -/-). Les résultats de cette étude démontrent que, lorsque les souris LPL -/- sont soumises à une diète athérogénique, la surface des lésions athéromateuses est réduite de 52%. Finalement, le groupe de Wilson K et coll. (Wilson et al., 2001) a généré des souris transgéniques apoE -/- surexprimant la LPL humaine au niveau macrophagique. L'étendue de l'occlusion aortique de ces souris était augmentée de 51% par rapport à des souris contrôles. Pris dans leur ensemble, ces travaux suggèrent qu'une inhibition de la production de LPL macrophagique pourrait contribuer à diminuer la formation des lésions athérosclérotiques.

#### **I.3.6.2.1 Mécanismes par lesquels la LPL macrophagique exerce ses effets pro-athérogéniques**

##### *L'activité lipolytique de la LPL*

La LPL peut promouvoir le développement de l'athérosclérose via son activité lipolytique. D'abord, la LPL présente dans la paroi vasculaire peut médier la lipolyse des VLDL, réduisant ainsi leur taille et enrichissant leur contenu en cholestéryl ester (Zilvermit, 1995). Les résidus ainsi produits sont captés par les macrophages (Lindqvist et al., 1983). De plus, les acides gras produits par la LPL peuvent être ré-estérifiés par les macrophages (Aviram et al., 1988). Le résultat net de ces effets est une accumulation de cholestéryl esters dans les macrophages et leur transformation en cellules spumeuses (Evans et al., 1993). L'hydrolyse des VLDL par la LPL conduit aussi à la formation de LDL, un

contributeur majeur au développement des lésions athéromateuses. Ces molécules de LDLs présentes dans la paroi sont susceptibles d'être oxydées par les radicaux libres, facilitant leur captation par les macrophages via les récepteurs scavenger, et contribuant de cette façon à la formation de cellules spumeuses (Mead et Ramji, 2002).

#### *La LPL macrophagique, un ligand athérogénique*

La LPL peut aussi jouer un rôle pro-athérogénique indépendamment de son activité lipolytique, c'est-à-dire en tant que ligand athérogénique. En raison de sa capacité à lier simultanément sur ses différents domaines, les lipoprotéines, les protéoglycans et les récepteurs cellulaires, la LPL, en s'associant conjointement aux lipoprotéines, aux HSPG et à divers récepteurs cellulaires des lipoprotéines tels que le LRP (protéine reliée au récepteur aux LDL), le récepteur aux LDL et le récepteur aux VLDL (Mead et al., 1999b), facilite la rétention et l'accumulation des lipoprotéines dans la matrice sous-endothéliale, ainsi que leur captation par les cellules vasculaires (Mead et al., 1999b). Cette fonction de pont moléculaire a été vérifiée récemment *in vivo* par Merkel et coll. (Merkel et al., 1998). Ces auteurs ont démontré que la LPL exprimée même sous sa forme inactive dans les muscles, liait les protéoglycans et induisait la captation des VLDL. La LPL peut aussi agir comme un pont entre deux types cellulaires différents. En formant un pont entre les HSPG exprimés à la surface des cellules endothéliales et les monocytes, elle semble faciliter l'adhésion des monocytes à l'endothélium, une étape cruciale dans le développement de l'athérosclérose (Mamputu et al., 1997; Obunike et al., 1997).

#### **I.4. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL**

La LPL est une enzyme clé du métabolisme lipidique. Il a été démontré que la LPL sécrétée par les macrophages dans la paroi vasculaire est pro-athérogénique. En effet, plusieurs études menées chez l'animal ont montré récemment que la LPL macrophagique favorisait la formation des cellules spumeuses et l'athérosclérose in vivo. Les sujets hypercholestérolémiques ont un risque 96 fois plus élevé de développer des MCV tandis que les sujets diabétiques de type 2 ont un risque cardiovasculaire de 2 à 4 fois plus élevé que la population générale. Malgré le rôle clé de la LPL macrophagique dans l'athérogénèse, la régulation de cette enzyme dans ces deux conditions pathophysiologiques est encore mal connue.

À ce jour, une seule étude a évalué l'expression de la LPL dans l'hypercholestérolémie familiale homozygote. Cette dernière a démontré une augmentation de la masse et de l'activité de la LPL plasmatique post-héparine dans cette pathologie. De manière intéressante, ces paramètres corrélaient positivement avec le degré d'athérosclérose chez les sujets porteurs de cette maladie. Il a été suggéré que l'augmentation de LPL plasmatique puisse refléter la production massive de LPL par les macrophages présents dans la paroi vasculaire (Dugi K et al, 1997).

Nous avons rapporté que les macrophages dérivés de monocytes isolés de sujets diabétiques de type 2 surexprimaient la LPL et avons proposé que des facteurs présents dans le sérum des sujets diabétiques puissent jouer un rôle clé dans cette augmentation. Des études subséquentes réalisées dans notre laboratoire ont démontré que des facteurs métaboliques altérés dans le diabète de type 2, tels que le glucose et les acides gras

induisaient l'expression de la LPL macrophagique in vitro. L'homocystéine et les produits terminaux de glycation sont deux candidats potentiels pouvant contribuer à l'augmentation de la LPL macrophagique dans le diabète de type 2 puisqu'ils sont retrouvés à des niveaux anormalement élevés chez les sujets diabétiques de type 2. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant des MCV et cette relation est plus forte dans le diabète de type 2. De plus, l'hyperhomocystéinémie est un facteur prédictif de mortalité dans le diabète de type 2. Pour leur part, les AGEs sont des protéines glyquées qui s'accumulent dans le plasma et les tissus des sujets diabétiques et contribuent de manière importante à la pathogenèse des vasculopathies diabétiques.

Le but de notre projet de recherche était d'étudier la régulation de la LPL macrophagique dans deux états pathophysiologiques associés à une athérosclérose accélérée et à une incidence accrue des MCV, à savoir l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote et le diabète de type 2.

Les hypothèses de notre travail étaient que :

- 1) Des macrophages dérivés de monocytes isolés de sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale (HF) hétérozygote surexprimaient la LPL.
- 2) L'homocystéine et les AGEs étaient des agents induisant l'expression de la LPL macrophagique in vitro.

Les objectifs spécifiques de notre travail étaient les suivants:

- 1) Caractériser l'expression de la LPL macrophagique dans l'HF et établir une corrélation entre ce paramètre et divers facteurs métaboliques ou inflammatoires chez ces patients tels le cholestérol total, le LDL cholestérol et le PDGF-BB.
- 2) Examiner l'effet direct de l'homocystéine et des AGEs sur l'expression de la LPL macrophagique et vérifier les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation.

## **II. Résultats**

**II.1. Premier article : *Macrophage lipoprotein lipase is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.***



Journal of Lipid Research. 2002; 43: 215-222

**MACROPHAGE LIPOPROTEIN LIPASE EXPRESSION IS INCREASED IN PATIENTS WITH HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA.**

Marie-Claude Beauchamp<sup>1</sup>, Éline Letendre<sup>1,2</sup> and Geneviève Renier<sup>1</sup>.

From the CHUM Research Centre and Metabolic Clinic, Notre-Dame Hospital, Department of Nutrition<sup>1</sup> and Medicine<sup>2</sup>, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Abbreviated title: Macrophage LPL in familial hypercholesterolemia.

Abbreviations:

LPL: lipoprotein lipase

FH: familial hypercholesterolemia

PDGF-BB: platelet-derived growth factor-BB

Total word count: 5 570

Abstract word count: 233

## SUMMARY

Familial hypercholesterolemia (FH) is associated with accelerated atherosclerosis. Based on the crucial role of macrophage LPL in atherogenesis, we determined in the present study macrophage LPL expression in patients with FH. Monocytes isolated from thirteen FH patients and thirteen control subjects were differentiated into macrophages by culturing the cells for 9 days in 20% autologous or heterologous serum. Macrophages of patients with FH cultured in their own sera showed a significant increase in LPL mRNA levels, extracellular LPL mass and activity compared to macrophages of control subjects. Although these alterations positively correlated with the levels of serum PDGF-BB in FH subjects, increased LPL secretion by cultured FH macrophages was neither reduced by immunoneutralizing FH serum with an anti-platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) antibody nor by culturing these cells in sera from control subjects. At the exception of LPL, levels of other cytokines and 8-isoprostane were not increased in the supernatants of macrophages of FH patients. Serum from FH patients also enhances the levels of LPL secreted by macrophages from control subjects. Immunoneutralization of FH serum with an anti-PDGF-BB antibody totally reversed this alteration. Overall, this study demonstrates that macrophages from FH subjects overproduce LPL and that PDGF present in the serum from FH patients stimulates LPL secretion by control macrophages. These findings suggest that macrophage LPL induction in patients with FH might be related to the increased atherogenesis observed in these subjects.

**Key words:** Lipoprotein lipase, macrophage, familial hypercholesterolemia.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis is an inflammatory lesion, the initiation and progression of which is driven and regulated by immune cells, namely monocytes/macrophages and T lymphocytes.<sup>1</sup> Among the earliest events in atherogenesis is the binding of monocytes to endothelium and their migration into the vessel wall.<sup>2</sup> Monocyte-derived macrophages present in the arterial wall release various proinflammatory molecules. Lipoprotein lipase (LPL), a key enzyme in lipid metabolism, is secreted by macrophages in the subendothelial space.<sup>3</sup> Evidence has been provided that LPL produced by macrophages in the vessel wall exerts pro-atherogenic effects. Indeed, it has been demonstrated that LPL content in the arterial wall increases with the progression of the lesion<sup>4</sup> and that a positive correlation exists between its accumulation in the vessel wall and that of cholesterol ester.<sup>5</sup> Furthermore, it has been shown that macrophage LPL expression is positively associated with atherosclerotic susceptibility in inbred mice<sup>6</sup> and that this enzyme induces foam cell formation and atherosclerosis in vivo.<sup>7,8</sup> The atherogenic effects of LPL have been mainly attributed to its ability to favor lipid accumulation within macrophages present in the atherosclerotic lesion.<sup>9-11</sup> Recently, we and others have proposed new mechanisms through which LPL may promote the development of atherosclerosis, including facilitation of monocyte adhesion to endothelial cells,<sup>12-14</sup> stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) secretion<sup>15,16</sup> and induction of vascular smooth muscle cell proliferation.<sup>17</sup>

Hypercholesterolemia is a causal factor of atherosclerosis and coronary heart disease. Patients with familial hypercholesterolemia (FH) are at increased risk of premature

atherosclerosis.<sup>18</sup> Evidence has recently been provided that plasma post-heparin LPL mass and activity are increased in homozygous FH patients compared to general population and that these biological parameters correlate with the extent of calcific atherosclerosis in these subjects.<sup>19</sup> Despite the key role of macrophage LPL in atherogenesis, the regulation of macrophage LPL in patients with FH has not been studied. The aim of the present study was to characterize macrophage LPL expression in patients with FH.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients.

The study group comprised thirteen patients with heterozygous FH and thirteen healthy control subjects. Patients, five males and eight females, were selected at the Lipid Clinic of the CHUM. These patients were originally diagnosed as having heterozygous FH based on well defined clinical and biochemical criteria namely LDL-cholesterol >95th percentile, presence of tendinous xanthomas and a familial history of hypercholesterolemia with autosomal mode of transmission. Presence of tendinous xanthomas was demonstrated in eight of the thirteen patients (62%). Additional criteria such as increase in LDL-cholesterol in the presence of tendinous xanthomas in a first-degree relative or a LDL-cholesterol >95th percentile in a child <10 years of age were considered in the absence of tendinous xanthomas. Secondary causes of hypercholesterolemia were excluded by biochemical testing and physical examination. The duration of FH in the study population varied from 2 to 18 years (mean:  $10.0 \pm 1.4$  years). All patients were treated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. One patient also received bile acid-binding resins (cholestyramine 4 gr/day and niacine 500 mg/day). None of the patients received fibrates. Four patients had proven cardiovascular disease and two had arterial hypertension. Four patients were hypothyroid and were treated with leuthyroxine (0.025 to 0.100 mg/day). Two patients received antioxidants (vitamin E 200IU/day and a multivitamin supplement) and two others were treated by anti-inflammatory drugs. Only

one patient was a smoker. Clinical and biochemical characteristics of the study population are shown in Table 1.

### **Protocol.**

The protocol was approved by the Notre-Dame Hospital ethic committee and informed written consent was obtained from all subjects. Blood samples for lipid and lipoprotein analysis were drawn in the morning after an overnight fast. To assess the role of peripheral factors in macrophage LPL regulation, plasma from control subjects and FH patients was collected from the heparinized blood used for monocyte isolation. Control subjects matched with patients for sex and age were recruited from the hospital staff and relatives. Subjects with infectious or inflammatory conditions were excluded from the study.

### **Reagents.**

Fetal calf serum (FCS) and heparin were purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT) and Sigma (St-Louis, MO), respectively. RPMI 1640 medium and Trizol reagent were obtained from Gibco BRL (Burlington, Ontario, Canada). Anti-platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) and IgG1 neutralizing antibodies were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

### **Measurements of plasma lipids and lipoproteins.**

All biochemical analyses were performed on a Beckman LX-20 multianalyzer (Beckman, California). Glucose, creatinine and thyroid stimulating hormone levels were measured to

screen for secondary causes of hypercholesterolemia. Lipoprotein fractions were determined on plasma samples obtained after a 14 hour-fasting period. Plasma total cholesterol concentrations were measured using a cholesterol esterase technique with dosage of the hydrolysis products.<sup>20</sup> Levels of HDL-cholesterol were determined by a timed end-point with dextran-sulfate precipitation. Values of LDL-cholesterol were calculated using the Friedewald equation. Triglyceride levels were assayed using a lipase assay with determination of the hydrolysis products.<sup>21</sup>

#### **Measurements of serum and extracellular macrophage LPL mass and activity.**

Preheparin LPL mass and activity in the serum of each subject under study and LPL immunoreactive mass and activity secreted by macrophages in the supernatants were determined using the Markit-F LPL kit, which measures both active and inactive LPL (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan)<sup>22</sup> and the Confluolip kit (Progen, Heidelberg, Germany)<sup>23</sup>, respectively. When the secretion media were assayed for LPL, 0.5 U/ml heparin was added to the medium one hour before the end of the incubation period. For LPL mass values falling below the level of detection, the minimum limit of detection, 20 ng/ml, was used for calculation. Levels of macrophage LPL mass and activity were normalized to levels of total cell proteins.

#### **Human macrophages.**

Fresh heparinized blood (100 ml) was obtained from patients and healthy donors in the morning. Human monocytes were isolated as previously described.<sup>24</sup> Briefly, peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll and allowed to

aggregate in the presence of FCS. Enriched monocyte preparations were further depleted in T and NK cells by rosetting with S-(2-aminoethyl) isothiouonium bromide-treated sheep red blood cells. Highly purified monocytes (85-90%) were obtained by density centrifugation, as assessed by FACS analysis. Lack of monocyte activation by the isolation procedure was confirmed by determination of the levels of TNF $\alpha$  released by the freshly isolated cells. Differentiation of monocytes into monocyte-derived macrophages was achieved by culturing freshly isolated monocytes in RPMI 1640 medium supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin and 20% (vol/vol) autologous or heterozygous serum. The cells were incubated for 8 days at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. The culture medium was changed at days 4 and 8. Levels of LPL mRNA, mass and activity were measured 24h after the last medium change. For experiments aimed at immunoneutralizing FH sera, sera were incubated for one hour at 37°C with 50 ng/ml PDGF-BB or control IgG1 isotype antibody then added to the culture medium of the cells. Fresh immunoneutralized serum was added at days 4 and 8 of culture.

#### **Analysis of LPL mRNA expression.**

Expression of the LPL gene in human macrophages was performed by polymerase chain reaction (PCR). Total RNA for use in the PCR reaction was extracted from human macrophages by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski and Sacchi.<sup>25</sup> Briefly, cells were lysed with Trizol reagent and chloroform was added to the solution. After centrifugation, the RNA present in the aqueous phase was precipitated and resuspended in diethyl pyrocarbonate water. cDNA was synthesized from RNA by

incubating 1  $\mu\text{g}$  of total cellular RNA with 0.1  $\mu\text{g}$  oligodT (Pharmacia, Piscataway, NJ) for 5 min at 98°C then by incubating the mixture with reverse transcription buffer for 60 min at 37°C. The cDNA obtained was amplified by using 0.8  $\mu\text{mol/l}$  of two synthetic primers specific for human LPL (5'-GAGATTTCTCTGTATGGCACC-3') (5'-CTGCAAATGAGACACTTTCTC-3') and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3') (5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3') used as internal standard in the PCR reaction mixture. A 277-base pair human LPL cDNA fragment and a 456-base pair human GAPDH cDNA fragment were amplified enzymatically by 22 repeated cycles at 95°C for 60 s, 60°C for 40 s, and 72°C for 90 s. An aliquot of each reaction mixture was then subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide. The intensity of the bands was measured by an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000; Packard Instruments, Meriden, CT).

**Determination of TNF $\alpha$ , interleukin- (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and PDGF-BB in the culture media of macrophages. Measurement of plasma PDGF-BB concentrations.**

The amounts of macrophage TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PDGF-BB and the concentrations of platelet-poor plasma PDGF-BB were determined by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Levels of macrophage cytokines were normalized to the levels of total cell proteins. The detection limit of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PDGF-BB are 4.4 pg/ml, 0.1 pg/ml, 0.094 pg/ml and 15 pg/ml, respectively. For IL-1 $\beta$  values falling below the level of detection, the lowest value of the

standard curve was used for calculation. The intra and interassay coefficients of variation of all these assays are less than 10%.

**Determination of 8-isoprostane (8-epi PGF2 $\alpha$ ) levels in the supernatants of macrophages.**

Free 8-epi PGF2 $\alpha$  levels were determined in the culture medium by enzyme immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).<sup>26</sup> The detection limit of 8-epi PGF2 $\alpha$  with this assay is 5 pg/ml. The intra and interassay coefficients of variation of this assay are less than 10%.

**Determination of total protein concentration.**

Total protein content was estimated according to the Bradford method<sup>27</sup> using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada).

**Statistical analysis.**

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test. The relationship between individual variables was determined by linear correlation analysis. A P value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### **Macrophage LPL mRNA levels, immunoreactive mass and activity in control subjects and FH patients.**

Macrophages of FH patients cultured in their own sera demonstrated a significant increase in LPL mRNA levels compared to those isolated from control subjects (Fig.1 A). Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of GAPDH was observed (Fig.1B). LPL mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA are presented in Fig.1C. (LPL mRNA levels (% over control values): controls:  $99.8 \pm 1.0$ ; FH patients:  $135.0 \pm 8.9$ , ( $P=0.007$ )). Macrophages of FH patients cultured in their own sera also secreted significantly higher LPL mass (Fig.1D) and activity (Fig.1E) than macrophages isolated from control subjects (LPL mass (ng/mg cell proteins/ml): controls:  $65.1 \pm 13.6$ ; FH patients:  $271.2 \pm 60.0$ ,  $P=0.005$ ); (LPL activity (pmol/mg cell proteins/ml): controls:  $148.4 \pm 20.5$ ; FH patients:  $215.0 \pm 37.5$ ,  $P=0.036$ ).

### **Pre-heparin serum LPL mass and activity in control subjects and FH patients.**

To determine whether increased levels of LPL mass and activity in the sera of FH patients might be responsible for the induction of Mo LPL in FH patients, the levels of serum LPL mass and activity were determined in control subjects and FH patients. Preheparin serum LPL mass and activity values did not significantly differ from those measured in the control subjects (Table 1).

### **Correlation between platelet-poor plasma PDGF-BB levels and macrophage gene expression, mass and activity in patients with FH.**

Because serum PDGF levels are increased in patients with FH<sup>28</sup> and that PDGF enhances macrophage LPL expression in vitro<sup>29</sup>, we next determined the levels of plasma PDGF-BB in 7 control subjects and 7 FH patients and evaluated whether a correlation exists between this parameter and macrophage LPL gene expression and secretion. Plasma PDGF-BB concentrations were significantly higher in patients with FH than in control subjects (PDGF-BB (pg/ml): controls:  $129.4 \pm 36.9$ ; FH patients:  $292.1 \pm 44.1$ ,  $P=0.013$ ). In contrast, PDGF-BB levels in the supernatants harvested from macrophages did not differ between the control and FH groups (PDGF-BB (ng/mg cell proteins/ml) controls:  $79.81 \pm 21.22$ ; FH patients:  $84.29 \pm 22.77$ ). A positive correlation between plasma PDGF-BB levels and macrophage LPL mRNA levels ( $r=0.680$ ,  $P=0.092$ ) (Fig.2A), mass ( $r=0.827$ ,  $P=0.02$ ) (Fig. 2B) and activity ( $r=0.82$ ,  $P=0.02$ ) (Fig. 2C) was found.

### **Relationship between macrophage LPL mass/activity and lipid profile.**

No significant correlation was found between levels of macrophage LPL mass or activity and parameters of lipid profile in the study population. Coefficients of correlation between macrophage LPL mass and total cholesterol or LDL cholesterol were  $R=0.559$  ( $P=0.093$ ) and  $R=0.559$  ( $P=0.093$ ), respectively. Coefficients of correlation between macrophage LPL activity and total cholesterol or LDL cholesterol were  $R=0.463$  ( $P=0.111$ ) and  $R=0.423$  ( $P=0.150$ ), respectively.

**Extracellular LPL immunoreactive mass and activity in macrophages of control subjects and FH patients cultured in heterologous serum.**

Culture of macrophages of control subjects in sera from FH patients significantly induced LPL mass and activity: (LPL mass (ng/mg cell proteins/ml): control cells cultured in control serum:  $65.1 \pm 13.6$ ; control cells cultured in FH serum:  $102.3 \pm 6.0$ ,  $P < 0.001$ ), (Fig. 3A); LPL activity (pmol/mg cell proteins/ml): control cells cultured in control serum:  $148.4 \pm 20.5$ ; control cells cultured in FH serum:  $255.4 \pm 20.3$ ,  $P < 0.001$ ), (Fig. 3B). In contrast, differentiation of macrophages from FH patients in the sera from control subjects did not significantly reduce the levels of LPL mass (Fig. 3A) and activity (Fig. 3B) secreted by these cells. (LPL mass (ng/mg cell proteins/ml): FH cells cultured in FH serum:  $271.2 \pm 60.0$ ; FH cells cultured in control serum:  $220.5 \pm 22.3$ ,  $P > 0.05$ ; LPL activity (pmol/mg cell proteins/ml): FH cells cultured in FH serum:  $215.0 \pm 37.5$ ; FH cells cultured in control serum:  $226.5 \pm 34.7$ ,  $P < 0.05$ ).

**Effect of PDGF-BB immunoneutralization of FH sera on macrophage LPL secretion in control subjects and FH patients.**

To evaluate the role of PDGF-BB in the increased LPL secretion that we documented in macrophages of control subjects cultured in sera from FH patients, control macrophages were differentiated for 8 days in PDGF-BB- or IgG<sub>1</sub>-immunoneutralized sera from 8 patients with FH. Twenty-four hours after the last medium change, the amount of LPL mass and activity secreted by these cells were measured. Control macrophages cultured in PDGF-BB- immunoneutralized FH sera showed a dramatic decrease in LPL mass (Fig. 4A)

and activity (Fig.4B) as compared to those cultured in non-immunoneutralized FH sera. In contrast, immunoneutralization of FH sera with IgG<sub>1</sub> did not affect the levels of LPL mass and activity secreted by these cells (LPL mass (ng/mg cell proteins/ml): control cells cultured in FH serum:  $102.3 \pm 6.0$ ; control cells cultured in IgG<sub>1</sub>-immunoneutralized FH serum:  $124 \pm 7.0$ ,  $P > 0.05$ ; LPL activity (pmol/mg cell proteins/ml): controls cells cultured in FH serum:  $255.4 \pm 20.3$ ; control cells cultured in IgG<sub>1</sub>-immunoneutralized FH serum:  $254.2 \pm 28.7$ ,  $P > 0.05$ ).

The effect of PDGF-BB immunoneutralization of FH sera on LPL secretion by FH macrophages was also evaluated. FH macrophages cultured in PDGF-BB-immunoneutralized FH sera showed similar levels of LPL secretion as compared to FH cells cultured in non-immunoneutralized or in IgG-immunoneutralized FH sera. (LPL mass (ng/mg cell proteins/ml): FH cells cultured in FH serum:  $271.2 \pm 60.0$ ; FH cells cultured in IgG<sub>1</sub>-immunoneutralized FH serum:  $215.7 \pm 16.9$ ; FH cells cultured in PDGF-BB-immunoneutralized FH serum:  $251.5 \pm 34.2$ ,  $P > 0.05$ ). (LPL activity (pmol/mg cell proteins/ml): FH cells cultured in FH serum:  $215.0 \pm 37.5$ ; FH cells cultured in IgG-immunoneutralized FH serum:  $196.0 \pm 18.9$ ; FH cells cultured in PDGF-BB-immunoneutralized FH serum:  $207.6 \pm 26.8$ ,  $P > 0.05$ ).

**Levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and 8-epi PGF2 $\alpha$  in the culture media of macrophages of control subjects and FH patients.**

To finally evaluate whether increased expression of macrophage LPL of FH subjects may reflect a generalized activation state of these cells, we next measured basal TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

IL-6 and 8-epi PGF2 $\alpha$  levels in the supernatants of macrophages of control subjects and FH patients. Macrophage TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production was similar in the FH and control groups (TNF $\alpha$  (pg/mg cell proteins/ml) controls:  $53.3 \pm 9.1$ ; FH patients:  $65.0 \pm 15.5$ ,  $P=0.515$ ; IL-1 $\beta$  (pg/mg cell proteins/ml) controls:  $1.65 \pm 0.26$ ; FH patients:  $2.013 \pm 0.44$ ,  $P=0.418$ ) (Fig.5 A and B). In contrast, a significant decrease in macrophage IL-6 secretion was observed in the FH group (IL-6 (pg/mg cell proteins/ml) controls:  $2.19 \pm 0.56$ ; FH patients:  $0.63 \pm 0.09$ ,  $P=0.023$ ) (Fig. 5C). There was a tendency toward increase in the 8-epi PGF2 $\alpha$  levels in the FH patients though not statistically significant (8-epi PGF2 $\alpha$  (pg/mg cell proteins/ml) controls:  $199.1 \pm 42.1$ ; FH patients:  $287.4 \pm 52.9$ ,  $P=0.207$ ) (Fig. 5D).

TABLE 1. Clinical characteristics of the patients with FH (n=13)

	FH Patients	Control subjects
Age (years)	$49.3 \pm 4.8$	$38.3 \pm 4.0$
Triglycerides (mmol/L)	$1.55 \pm 0.26$	$1.04 \pm 0.13$
Cholesterol (mmol/L)		
Total	$7.28 \pm 0.74^*$	$4.64 \pm 0.21$
LDL	$5.46 \pm 0.70^*$	$2.74 \pm 0.09$
HDL	$1.11 \pm 0.08$	$1.42 \pm 0.17$
Serum LPL mass (ng/mL)	$\leq 20$	$\leq 20$
Serum LPL activity (pmol/mL)	$3.5 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.3$

\*  $P < 0.05$

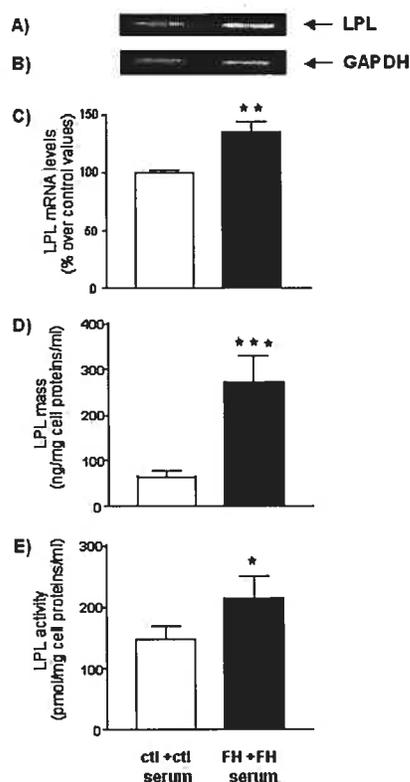


Fig.1. LPL mRNA levels, immunoreactive mass and activity in macrophages of control subjects (ctl) and patients with FH (FH). Monocytes isolated from control subjects or patients with FH were cultured for 8 days in RPMI medium containing 20% of their own sera. Twenty-four hours after the last medium change, cells were lysed and LPL (A) and GAPDH (B) mRNA expression was analyzed by reverse transcription-PCR. (C) LPL mRNA levels normalized to the levels of GAPDH levels. LPL immunoreactive mass (D) and activity (E) were determined in the cell supernatants. Results represent the mean + SEM of data obtained from 13 control subjects and 13 patients with FH. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  vs controls.

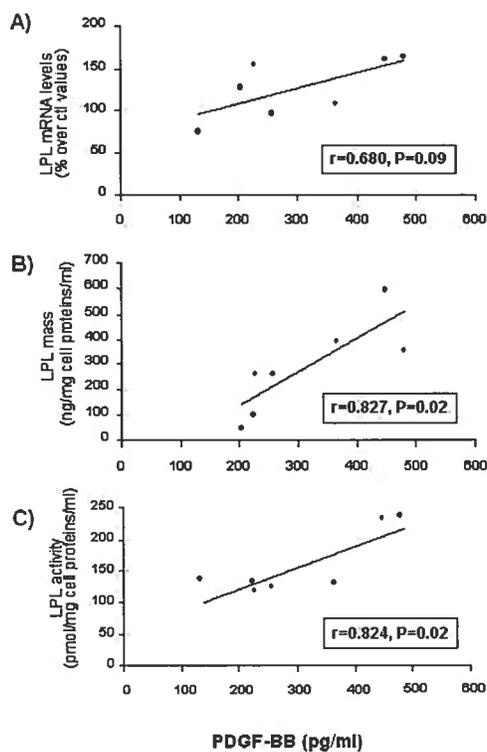


Fig.2. Scatterplots showing the correlations between platelet-poor plasma PDGF-BB levels in FH patients (n=7) and LPL mRNA levels (A), immunoreactive mass (B) and activity (C) from macrophages of FH patients cultured in their own sera.

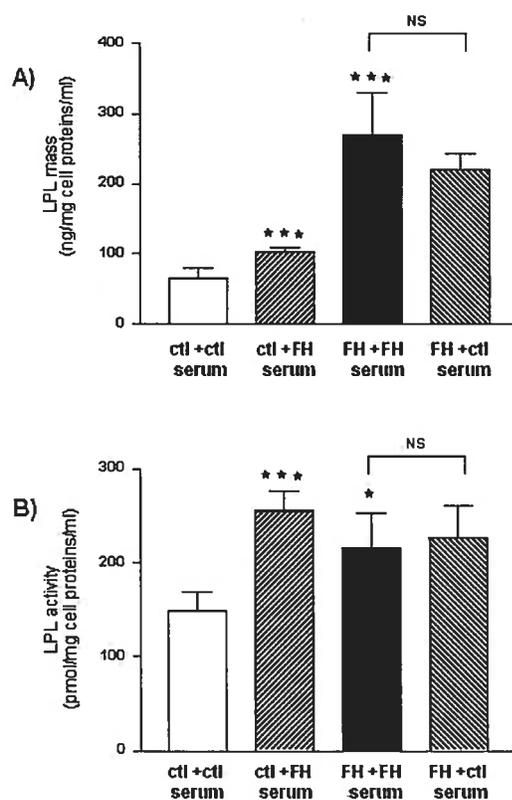


Fig.3. LPL immunoreactive mass and activity secreted by macrophages of control subjects (ctl) and patients with FH (FH). Monocytes isolated from control subjects (n=13) or patients with FH (n=13) were cultured for 8 days in RPMI medium containing 20% of their own sera. In some experiments, monocytes of control subjects were differentiated in sera of FH patients (n=7) and monocytes of FH patients were differentiated in sera of control subjects (n=7). Twenty-four hours after the last medium change, LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) were determined in the cell supernatants. \*,  $P < 0.05$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  vs controls.

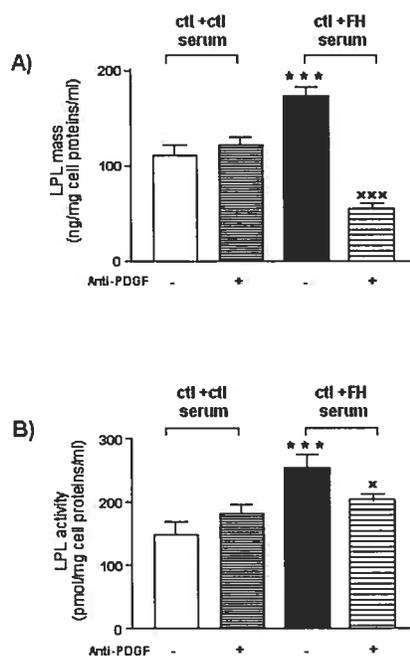


Fig.4. LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) secreted by control macrophages cultured in PDGF-BB- (50ng/ml) immunoneutralized FH sera. Monocytes isolated from control subjects were cultured for 8 days in RPMI medium containing 20% control sera, PDGF-BB-immunoneutralized control sera, FH sera or PDGF-BB-immunoneutralized FH sera. Twenty-four hours after the last medium change, LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) were determined in the medium. \*\*\*,  $P < 0.001$  vs ctl macrophages + ctl serum; \*,  $P < 0.05$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  vs ctl macrophages + FH serum.

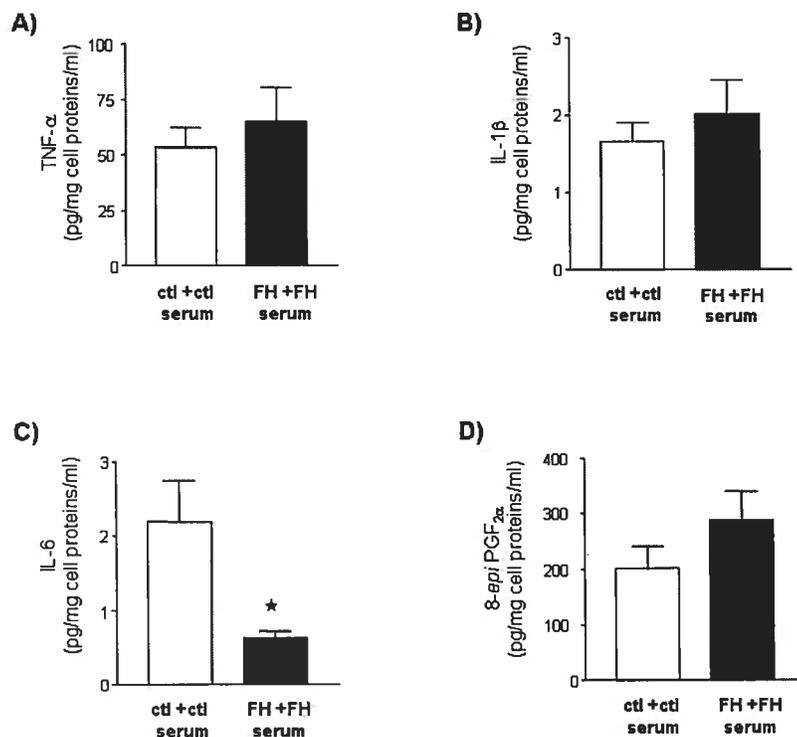


Fig.5. Levels of TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) and 8-*epi*-PGF $_{2\alpha}$  (D) in the supernatants of macrophages of control subjects (ctl) or patients with FH (FH). Monocytes isolated from control subjects or patients with FH were cultured for 8 days in RPMI medium containing 20 % of their own sera. Twenty-four hours after the last medium change, the levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and 8-*epi*-PGF $_{2\alpha}$  were determined in the medium. Results represent the mean  $\pm$  SEM of data obtained from 13 control subjects and 13 patients with FH. \*P<0.05 vs controls.

## DISCUSSION

Evidence has been provided that secretion of LPL by macrophages in the arterial wall promotes the development of atherosclerosis *in vivo*.<sup>7,8</sup> The present study demonstrates that macrophages isolated from patients with FH express higher levels of LPL mRNA and secrete larger amounts of LPL than macrophages isolated from control normolipidemic subjects. The parallel increase of LPL mRNA levels and LPL immunoreactive mass/activity observed in our study indicates a pre-translational control of macrophage LPL expression in FH patients. The mechanism(s) underlying the induction of macrophage LPL mRNA expression in FH patients may involve both transcriptional and/or post-transcriptional events. Although the limited amounts of biological material extracted from human cells did not allow us to perform run-on experiments or to measure LPL mRNA stability, upregulation of macrophage LPL gene expression in FH may theoretically occur at the transcriptional level as a result of increased serum PDGF-BB and/or cholesterol levels. Indeed, evidence has been provided that PDGF-BB upregulates human macrophage LPL mRNA levels<sup>29</sup> and that LPL expression is subject to regulation by cellular sterol levels through interaction of sterol regulatory element binding proteins (SREBP) with a sterol regulatory element spanning -90 to -81 in the LPL promoter.<sup>30-31</sup>

Although the mechanisms responsible for macrophage LPL induction in FH remain uncertain, our finding that culture of FH macrophages in control sera does not significantly reduce this alteration indicate that peripheral factors are not key determinants of macrophage LPL overproduction in FH. Specifically, our results which show that

neutralization of PDGF in FH sera does not reduce the levels of LPL secreted by FH macrophages clearly demonstrate that, despite the positive association between serum PDGF-BB levels and macrophage LPL expression in FH patients, PDGF-BB is not the cause of macrophage LPL overproduction in patients with FH. LPL induction associated with FH may rather reflect some genetically controlled differences in LPL expression in the FH macrophage population. This possibility is supported by our previous observation that high macrophage LPL expression is associated with susceptibility to atherosclerosis in inbred mice<sup>6</sup> and that alteration of intracellular cholesterol metabolism regulates the steady state levels of LPL mRNA.<sup>31</sup> Alternatively, because inflammatory macrophages produce large amounts of LPL, macrophage LPL upregulation in subjects with FH may reflect a general pro-inflammatory monocyte/macrophage cytokine profile in hypercholesterolemic patients. It has been previously suggested that FH could be associated with some alterations of monocyte/macrophage function, such as enhanced TNF $\alpha$  production in response to lipopolysaccharide.<sup>32,33</sup> To assess the state of activation of macrophages of patients with FH, we measured the ability of these cells to spontaneously release cytokines and generate 8-epi PGF2 $\alpha$  in the supernatants. Our results which demonstrate that FH macrophages do not produce higher amounts of cytokines and 8-epi PGF2 $\alpha$  than control cells clearly indicate that these cells are not inflammatory macrophages and that inflammation may therefore not account for the increase in macrophage LPL expression described here.

Along with the observation that macrophages from FH patients overproduce LPL, we found that serum from FH patients increases LPL levels in macrophages from control subjects. Determination of the levels of LPL mass released by control macrophages exposed to FH

sera demonstrates that the amounts of LPL mass secreted by these cells were much lower than those produced by macrophages from FH subjects. These data clearly indicate that peripheral factors present in the sera from FH patients stimulate LPL secretion by control macrophages and further stress the marginal role of these factors in the dysregulation of macrophage LPL secretion in patients with FH. Because increase in post-heparin serum LPL mass and activity levels has been reported in patients with homozygous FH<sup>19</sup>, accumulation of LPL in the sera of FH patients may account for the induction of macrophage LPL in patients with FH. Our results which demonstrate that pre-heparin serum LPL mass and activity do not differ in the control and FH groups do not argue for a role of this factor in the dysregulation of macrophage LPL that we documented herein. Other LPL-stimulatory factors that may accumulate in the serum of FH subjects include triglycerides<sup>34</sup>, total or LDL cholesterol<sup>35</sup> and PDGF.<sup>28</sup> Because all the patients recruited in our study were normotriglyceridemic, hypertriglyceridemia does not seem to account for macrophage LPL alteration in patients with FH. Alternatively, macrophage LPL may be induced by hypercholesterolemia. Although we did not establish a statistically significant correlation between macrophage LPL and plasma cholesterol levels in patients with FH, the currently documented correlation coefficients of 0.56 may be suggestive given the small sample size in the present study. To the best of our knowledge, only one study has so far examined the in vitro effect of cholesterol on human macrophage LPL regulation. Although this study reported a slight increase in LPL activity and mRNA levels in macrophages exposed to native LDL, this effect did not achieve statistical significance.<sup>35</sup> From these data, it appears that definitive conclusions about the role of cholesterol in the control of

macrophage LPL require further studies. Because PDGF is increased in the serum of heterozygous FH patients<sup>28</sup> and stimulates human macrophage LPL expression *in vitro*<sup>29</sup>, this factor may be involved in the upregulation of macrophage LPL in control cells differentiated in FH sera. Our finding that circulating PDGF-BB levels are increased in FH patients and that PDGF-BB immunoneutralization of FH sera markedly decreases LPL secretion by control macrophages exposed to sera from FH patients clearly supports a role of this factor as a macrophage LPL stimulatory molecule.

Dugi et al have recently demonstrated that a positive correlation exists between post-heparin plasma LPL and the extent of calcific atherosclerotic lesions in these subjects.<sup>19</sup> These authors have proposed that elevation of plasma LPL could reflect the massive production of LPL by macrophages in the atherosclerotic arterial vessel and may therefore represent the consequence of the developing atherosclerosis in these patients. In accordance with Dugi's hypothesis, the present study demonstrates that macrophages isolated from patients with heterozygous FH overproduce LPL. This observation suggests that FH may tend to increase the *in vivo* production of LPL in the arterial wall and that high LPL secretion may contribute to the development and progression of the atherogenic process taking place in the vessel wall of subjects with FH. Given the small number of patients recruited in this study and the well documented heterogeneity of the FH population, prospective randomized clinical studies in a large number of newly diagnosed FH patients, before and after therapeutic interventions, are imperative. These studies may provide further insight into the role of macrophage LPL in the accelerated atherosclerosis associated with FH.

**REFERENCES**

1. Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126.
2. Stemme S., G.K. Hansson. Immune mechanisms in atherogenesis. *Ann Med.* 1994; 26: 141-146.
3. Mattsson L., H. Johansson, M. Ottosson, G. Bondjers, O. Wiklund. Expression of lipoprotein lipase mRNA and secretion in macrophages isolated from human atherosclerotic aorta. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1759-1765.
4. Corey J.E., D.B. Zilversmit. Effect of cholesterol feeding on arterial lipolytic activity in the rabbit. *Atherosclerosis.* 1977; 27: 201-212.
5. Zilversmit D.B. Atherogenesis : a postprandial phenomenon. *Circulation.* 1979; 60: 473-485.
6. Renier G., E. Skamene, J.B. DeSanctis, D. Radzioch. High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 190-196.
7. Babaev V.R., S. Fazio, L.A. Gleaves, K.J. Carter, C.F. Semenkovich, M.F. Linton. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1697-1705.

8. Van Eck M., R. Zimmerman, P.H. Groot, R. Zechner, T.J. Van Berkel. Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: E53-62.
9. Lindqvist P., A.M. Ostlund-Lindqvist, J.L. Witztum, D. Steinberg, J.A. Little. The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J Biol Chem.* 1983; 258: 9086-9092.
10. Ostlund-Lindqvist A.M., S. Gustafson, P. Lindqvist, J.L. Witztum, J.A. Little. Uptake and degradation of human chylomicrons by macrophages in culture : role of lipoprotein lipase. *Arteriosclerosis.* 1983; 3: 433-440.
11. Ishibashi S., N. Yamada, H. Shimano, N. Mori, H. Mokuno, T. Gotohda, M. Kawakami, T. Murase, F. Takaku. Apolipoprotein-E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem.* 1990; 265: 3040-3047.
12. Mamputu J-C., A-C. Desfaits, G. Renier. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* 1997; 38: 1722-1729.
13. Saxena U., N.M. Kulkarni, E. Ferguson, R.S. Newton. Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 189: 1653-1658.
14. Obunike J.C., S. Paka, S. Pillarisetti, I.J. Goldberg. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1414-1420.

15. Renier G., E. Skamene, J.B. DeSanctis, D. Radzioch. Induction of tumor necrosis factor alpha gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1994; 35: 2271-2278.
16. Mamputu J-C., G. Renier. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and production. A process involving cell surface proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1405-1411.
- 
17. Mamputu J-C., G. Renier. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2212-2219.
18. Leiv O. An update on familial hypercholesterolaemia. *Ann Med.* 1999; 31: 13-18.
19. Dugi K.A., I.M. Feuerstein, S. Hill, J. Shih, S. Santamarina-Fojo, H.B. Jr Brewer, J.M. Hoeg. Lipoprotein lipase correlates positively and hepatic lipase inversely with calcific atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 354-364.
20. Allain C.C., L.S. Poon, C.S. Chan, W. Richmond, P.C. Fu. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974; 20: 470-475.
21. Bucolo G., H. David. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973; 19: 476-482.
22. Ikeda Y., A. Takagi, Y. Ohkaru, K. Nogi, T. Iwanaga, S. Kurooka, A. Yamamoto. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic

triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res.* 1990; 31: 1911-1924.

23. Duque M., M. Graupner, H. Stutz, I. Wicher, R. Zechner, F. Paltauf, A. Hermetter. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res.* 1996; 37: 868-876.

24. Mentzer S.J., P.M. Guyre, S.J. Burakoff, D.V. Faller. Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol.* 1986; 101: 312-319.

25. Chomczynski P., N. Sacchi. Single-step method for RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroforme extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-159.

26. Pradelles P., J. Grassi, J. Maclouf. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: An alternative to radioimmunoassays. *Anal Chem.* 1985; 57: 1170-1173.

27. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

28. Bath P.M.W., J.F. Martin. Serum platelet-derived growth factor and endothelin concentrations in human hypercholesterolemia. *J Int Med.* 1991; 230: 313-317.

29. Inaba T., M. Kawamura, T. Gotoda, K. Harada, M. Shimada, J. Ohsuga, H. Shimano, Y. Akanuma, Y. Yazaki, N. Yamada. Effects of platelet-derived growth factor on the

synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 522-528.

30. Shimano H., J.D. Horton, R.E. Hammer, I. Shimomura, M.S. Brown, J.L. Goldstein. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1575-1584.

31. Schoonjans K., L. Gelman, C. Haby, M. Briggs, J. Auwerx. Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E Boxes. *J Mol Biol.* 2000; 304: 323-334.

32. Leirisalo-Repo M., M. Jaattela, H. Gylling, T.A. Miettinen, H. Repo. Phagocyte function in familial hypercholesterolaemia: peripheral blood monocytes exposed to lipopolysaccharide show increased tumour necrosis factor production. *Scand J Immunol.* 1990; 32: 679-685.

33. Rovers C., M.G. Netea, N. de Bont, P.N. Demacker, C. Jacobs, B.J. Kullberg, J.W. van der Meer, A.F. Stalenhoef. LPS-induced cytokine production and expression of beta2-integrins and CD14 by peripheral blood mononuclear cells of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1998; 141: 99-105.

34. Ishibashi S., N. Mori, T. Murase, H. Shimano, T. Gotohda, M. Kawakami, Y. Akanuma, F. Takaku, N. Yamada. Enhanced lipoprotein lipase secretion from human monocyte-derived macrophages caused by hypertriglyceridemic very low density lipoproteins. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 650-655.

35. Stengel D., M. Antonucci, W. Gaoua, C. Dchet, P. Lesnik, D. Hourton, E. Ninio, M.J. Chapman, S. Griglio. Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state: a key role for lysophosphatidylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1172-1180.

**II.2. Deuxième article: *Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-fos and lipoprotein lipase expression in macrophages.***

**Déclaration des coauteurs**

1. Marie-Claude Beauchamp, PhD Nutrition, 3-320-1-0.

2. Beauchamp MC, Renier G. (2002) Homocysteine induces protein kinase C and stimulates c-fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes*, 51: 1180-1187.

3. Déclaration de tous les coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Claude Beauchamp inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique dans l'hypercholestérolémie familiale et le diabète de type 2.*

Genevieve Renier  
Coauteur

G. Renier  
Signature

18/05/2004  
Date

Diabetes, 2002; 51 : 1180-1187.

**HOMOCYSTEINE INDUCES PROTEIN KINASE C ACTIVATION AND  
STIMULATES c-FOS AND LIPOPROTEIN LIPASE EXPRESSION IN  
MACROPHAGES.**

Marie-Claude Beauchamp and Geneviève Renier.

From the CHUM Research Centre, Notre-Dame Hospital, Department of Nutrition,  
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: Homocysteine induces macrophage LPL.

Reprint requests to:  
Dr Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
Research Centre, 3<sup>rd</sup> floor, door Y-3622  
1560 Sherbrooke Street East  
Montreal, Quebec, H2L 4M1  
Phone : (514) 890-8000 #26895  
FAX : (514) 412-7661  
E-MAIL : [genevieve.renier@umontreal.ca](mailto:genevieve.renier@umontreal.ca)

## SUMMARY

Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular disease in human diabetes. Among the multiple factors that may account for the atherogeneity of homocysteine (Hcys) in patients with diabetes, macrophage (Mo) lipoprotein lipase (LPL) has unique features in that it is increased in human diabetes and acts as a pro-atherogenic factor in the arterial wall. In the present study, we determined the direct regulatory effect of Hcys on Mo LPL gene expression and secretion. Incubation of J774 Mo with Hcys increases, in a time- and dose-dependent manner, LPL mRNA expression and secretion. Induction of LPL gene expression was biphasic, peaking at 1 and 6 hours. While Hcys treatment increased protein kinase C (PKC) activity in Mo, pretreatment of Mo with PKC inhibitors, totally suppressed Hcys-induced LPL mRNA expression. Hcys also increases the levels of c-fos mRNA in Mo and enhances nuclear protein binding to the AP-1 sequence of the LPL gene promoter. Overall, these results demonstrate that Hcys stimulates Mo LPL, both at the gene and protein levels and that Hcys-induced LPL mRNA expression requires PKC activation. They also suggest a possible role of c-fos in the stimulatory effect of Hcys on Mo LPL mRNA expression. These observations suggest a new mechanism by which Hcys may exert its pro-atherogenic effects in human diabetes.

## INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the leading causes of morbidity and mortality in patients with diabetes. The high risk of cardiovascular disease in these subjects cannot be totally explained by classical risk factors. Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular disease in the general population (1-5). In the diabetic population, the association between hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease seems even stronger (6-10). Furthermore, this risk factor may predict mortality in patients with type 2 diabetes (9-10).

Several mechanisms have been proposed to explain the atherogenic properties of homocysteine (Hcys). In particular, it has been shown that Hcys promotes smooth muscle cells proliferation (11), activates the protein kinase C (PKC)/c-fos signaling pathway (12) and induces platelet aggregation (13), lipoprotein oxidation and activation of the coagulation pathway (13).

Lipoprotein lipase (LPL), a key enzyme in lipid metabolism, is secreted by macrophages (Mo) in atherosclerotic lesions (14). Mo LPL produced in the vascular wall acts as a pro-atherogenic protein. Indeed, this enzyme mediates the uptake of lipoproteins by Mo (15-17), promotes lipoprotein retention to the extracellular matrix (18,19), induces the expression of the pro-atherogenic cytokine tumor necrosis factor alpha (20,21), increases monocyte adhesion to endothelial cells (22-24) and proliferation of vascular smooth muscle cells (25). Recently, evidence has been provided that Mo LPL promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo (26-29). The regulation of Mo LPL in the arterial wall is poorly understood but may involve metabolic factors. This hypothesis is

supported by our previous findings that Mo LPL is increased in patients with type 2 diabetes (30) and that metabolic factors dysregulated in diabetes such as glucose (31) and fatty acids (32) enhance Mo LPL expression. Based on these findings and on the high levels of serum Hcys in patients with diabetes, we sought to evaluate the direct regulatory effect of Hcys on Mo LPL expression and to determine the molecular mechanism(s) involved in this effect.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT), DL-Hcys, L-cysteine and heparin were obtained from Sigma (St-Louis, MO). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) and Trizol reagent were purchased from Gibco BRL (Burlington, Ontario, Canada). Calphostin C was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA).

### **Murine macrophages**

The J774 murine macrophage cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). J774 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS and 100 µg/ml penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada).

### **Analysis of mRNA expression**

Six millions J774 cells were plated in plastic petri dishes (100×20mm) (Falcon, Lincoln Park, NJ). After treatment with Hcys, cells were lysed with Trizol reagent. Total RNA was isolated and separated in a 1.2% agarose gel containing 2.2 mol/l formaldehyde as previously described (33). The blots were prehybridized for 8h. The mRNA expression was analyzed by hybridization with [<sup>32</sup>P]dCTP-labeled LPL, c-fos and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA probes. Hybridization was detected by autoradiography with Kodak X-Omat-AR films (Rochester, NY). mRNA expression was quantified by high resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000, Packard Instruments, Meriden, CT).

### **Electrophoretic mobility shift assay**

The isolation of the nuclei was performed as follows. Briefly,  $5 \times 10^7$  J774 cells were collected, washed with cold phosphate-buffered salt solution (PBS), and lysed in 1 ml ice-cold buffer A (15 mmol/l KCL, 2 mmol/l  $MgCl_2$ , 10 mmol/l HEPES, 0.1 % phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5% Nonidet-P-40). After a 10-min incubation on ice, lysed cells were centrifuged, and the nuclei were washed with buffer A without Nonidet P-40. The nuclei were then lysed in a buffer containing 2 mol/l KCL, 25 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l EDTA, and 1 mmol/l dithiothreitol (DTT). After a 15-min incubation period, a dialysis buffer (25 mmol/l HEPES, 1 mmol/l DTT, 0.1 % PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.1 mmol/l EDTA, and 11% glycerol) was added to the nuclei preparation. Nuclei were collected by centrifugation for 20 min at 13,000 rpm. Aliquots (50  $\mu$ l) of the supernatants were frozen at  $-70^\circ C$ , and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assays were performed as previously described by Fried and Crothers (34). Briefly, 5  $\mu$ g nuclear extracts were incubated for 15 min in the presence of 5X binding buffer (125 mmol/l HEPES, pH 7.5, 50 % glycerol, 250 mmol/l NaCl, 0.25 % Nonidet P-40, and 5 mmol/l DTT). End-labeled double-stranded consensus sequences of the LPL promoter AP-1-enhancing element (20 000 cpm per sample) were then added to the samples for 30 min. Samples were analyzed on a 4 % nondenaturing polyacrylamide gel containing 0.01% Nonidet P-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from murine Mo with labeled DNA probe in the presence of a 1000-fold molar excess of unlabeled DNA probe.

### **DNA probes**

The cDNA probe for detection of murine LPL was prepared by the polymerase chain reaction technique. cDNA was obtained from total RNA using a reverse transcription reaction. Two synthetic primers spanning bases 255-287 and 1117-1149 of the LPL cDNA were used to enzymatically amplify a 894-bp region of the LPL probe. The cDNA probes for murine c-fos and GAPDH were purchased from American Type Culture Collection. A 20-mer double-stranded oligonucleotide (5'-GGGCACCTGACTAAGGCCAG-3'; 5'-TGTGCTGGCCTTAGTCAGGT-3') containing the consensus sequence for the AP-1 responsive element of the murine LPL gene promoter (35,36) was synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer. After annealing, the double-stranded oligonucleotide was labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP by using the Boehringer Mannheim 5' end-labeling kit (Indianapolis, IN).

### **Determination of human LPL immunoreactive mass and activity**

One hour before the end of the incubation period, 50 U/ml heparin was added to the medium. The amount of LPL immunoreactive mass was measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the Markit-F LPL kit (Dainippon, Pharmaceutical, Osaka, Japan) (37). Extracellular LPL activity was determined using the Confluolip kit (Progen, American research products, USA) (38). LPL mass and activity values were normalized to the levels of total cell proteins.

### **Measurement of PKC activity**

Adherent murine J774 Mo were recovered and homogenized (Dounce : 15 strokes) in 500  $\mu$ l of ice-cold buffer A (20 mmol/l Tris [pH 7.5], 0.5 mmol/l EDTA, 0.5 mmol/l EGTA, 25

$\mu\text{g/ml}$  aprotinin, and  $25 \mu\text{g/ml}$  leupeptin). The membrane and cytosolic fractions were separated by ultracentrifugation ( $100\ 000g$  for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$ ). After recovery of high-speed supernatants containing cytosolic PKC, the corresponding membrane pellets were homogenized in  $500 \mu\text{l}$  of buffer A containing 0.5% Triton X-100. The enzyme from both fractions was partially purified through DE52 chromatography columns. After removal of unbound proteins by washing of the columns with buffer B ( $20 \text{ mmol/l}$  Tris, pH 7.5,  $0.5 \text{ mmol/l}$  EDTA,  $0.5 \text{ mmol/l}$  EGTA), fractions containing PKC were eluted with buffer C (Tris [pH 7.5],  $0.5 \text{ mmol/l}$  EDTA,  $0.5 \text{ mmol/l}$  EGTA,  $10 \text{ mmol/l}$   $\beta$ -mercaptoethanol, and  $0.2 \text{ mol/l}$  NaCl). Eluates were analyzed for PKC activity, following the optimum conditions of the assay, by measuring the incorporation of  $^{32}\text{P}$  into the synthetic peptide Ac-myelin basic protein<sup>4-14</sup>. The specificity of the assay was determined by subtracting the radioactivity obtained in the presence of the pseudosubstrate inhibitor PKC<sup>19-36</sup> from total radioactivity. PKC activity was normalized to the levels of total cell proteins. Data were expressed as percentages considering the control as 100% activity.

#### **Determination of total protein concentrations**

Total protein content was measured according to the Bradford method (39) using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada).

#### **Statistical analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data were analysed by student *t*-test for comparison of two groups or by one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test or the Dunn's method for multiple comparisons. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### **Effect of Hcys on Mo LPL mRNA expression**

Incubation of J774 cells for 1 to 24 hours with Hcys increased Mo LPL gene expression in a time-dependent manner. Induction of Mo LPL mRNA levels in response to Hcys (1-5 mmol/L) was biphasic, peaking at 1 and 6 hours (Fig.1A). Maximal effect was observed after a 6-h incubation period in the presence of 5mmol/L Hcys. Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of GAPDH, used as internal control, was observed. LPL mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA are illustrated in Fig.1A. No stimulatory effect of cysteine (1mmol/L) was observed on Mo LPL mRNA levels thereby indicating a specific effect of Hcys on macrophage LPL gene expression (LPL mRNA levels [% increase of control values]: cysteine 1 mM :1h : 94.2 ± 8.2; 6 h :100.0 ± 9.1).

To further characterize the kinetic of the early induction of LPL gene expression in response to Hcys, J774 cells were incubated in the presence of 1mmol/L Hcys for 15, 30, 45 and 60 minutes. As shown in Fig.1B, a significant increase in Mo LPL mRNA levels was detected after a 30-min incubation period with Hcys. Maximal effect was observed at 45- and 60-min incubation period. LPL mRNA levels normalized to the levels of GAPDH are presented in Fig.1B.

**Dose-dependent effect of Hcys on Mo LPL mRNA expression and immunoreactive mass.**

To assess the optimal concentration of Hcys required to stimulate Mo LPL gene expression, J774 cells were incubated for 60 min in the presence of increasing concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 or 5 mmol/L) of Hcys. While Mo LPL mRNA expression remained unchanged in cells exposed to 0.01 and 0.05 mmol/L Hcys, a significant increase in this parameter was found in presence of 0.1mmol/L Hcys (Fig. 2A). Maximal levels of LPL mRNA were observed after culture of the cells with 0.5 to 1 mmol/L Hcys. A similar dose-dependent effect of Hcys on LPL mRNA expression was observed in Mo exposed for 6 hours to Hcys (data not shown). Recovery of enhanced amounts of LPL immunoreactive mass from the culture media reflected the increase in LPL mRNA expression of Hcys-treated J774 cells. To determine the dose-dependent effect of Hcys on Mo LPL secretion, J774 cells were incubated for 24 hr with increasing concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1 or 5 mmol/L) of Hcys. While a small induction of LPL secretion was already observed in Mo exposed to 0.2 to 0.5 mmol/L, the effect of Hcys on Mo LPL secretion reached statistical significance only at concentrations of 1 to 5 mmol/L (Fig.2B).

**Time-dependent effect of Hcys on Mo LPL mass and activity**

Macrophages exposed for 24 to 72 hours to Hcys (1-5 mmol/L) showed a sustained 2-fold increase in LPL mass secretion (Fig.3A). Determination of Mo LPL activity in the supernatants of J774 cells exposed to 5 mmol/L Hcys showed a moderate increase in this

parameter (Fig.3B). In contrast, the levels of extracellular LPL activity in cells treated with 1 mmol/L Hcys remained unchanged (Fig.3B).

### **Role of PKC on Hcys-stimulated LPL gene expression**

To determine whether PKC may represent the signaling pathway involved in the upregulation of Mo LPL gene expression by Hcys, J774 cells were pre-treated for 30 minutes in the presence or absence of the specific PKC inhibitor calphostin C (0.5  $\mu$ g/ml), then treated for 1 hour with 1 mmol/L Hcys. As shown in Fig.4A, calphostin C totally abolished the stimulatory effect of Hcys on Mo LPL gene expression. Similar effect was observed when J774 cells were pretreated with the PKC inhibitors GF109203X (20 nM) and chelerythrine (0.5  $\mu$ M). (LPL mRNA levels [% of control values]: controls: 100.0  $\pm$  1.6; Hcys: 145.2  $\pm$  5.5; GF109203X: 79.0  $\pm$  11.8, GF109203X + Hcys: 73.0  $\pm$  11.1,  $P < 0.05$  vs Hcys; chelerythrine: 95.3  $\pm$  7.2, chelerythrine + Hcys: 94.3  $\pm$  7.7,  $P < 0.05$  vs Hcys). To further establish the involvement of PKC in Hcys-stimulated Mo LPL mRNA expression, we measured PKC activity in cytosolic and particulate fractions of Hcys-treated J774 cells (Fig.4B). A maximal increase in PKC activity in the membrane fraction of Mo was observed after a 10-min exposure of the cells to 1 mmol/L Hcys.

### **Effect of Hcys on Mo c-fos mRNA levels**

To assess the effect of Hcys on Mo c-fos gene expression, J774 cells were incubated for 15 to 60 min with 1 mmol/L Hcys (Fig.5A). Exposure of Mo for 15 min to Hcys led to a significant induction of basal c-fos gene expression. Maximal effect was observed after a

30- to 45-min incubation period. As illustrated on Fig.5B, induction of Mo c-fos gene expression was dose-dependent, with a maximal effect occurring at a Hcys concentration of 1 mmol/L.

**Effect of Hcys on the binding of nuclear proteins to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter**

We next determined whether incubation of J774 cells in the presence of Hcys might induces changes at the level of LPL gene promoter binding proteins. We found that a 15- to 30-min exposure of J774 cells to Hcys led to a major increase in the binding of nuclear proteins to the AP-1 consensus sequence of the LPL promoter. Maximal effect was observed after a 15-min incubation period (Fig.6). This binding complex was specifically competed in the presence of a 1000-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide.

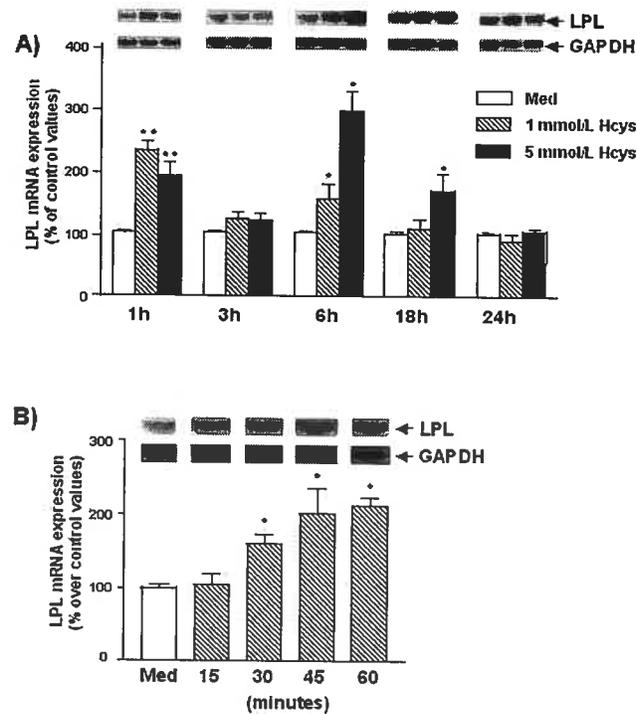


Fig.1. Effect of Hcys on Mo LPL mRNA levels. J774 cells were cultured in the presence of 1 or 5 mmol/L Hcys for 1, 3, 6, 18 and 24 hours (A) or in the presence of 1 mmol/L Hcys for 15, 30, 45 and 60 minutes (B). At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL and GAPDH mRNA expression. Levels of LPL mRNA were normalized to the levels of GAPDH mRNA. Results represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs medium (Med).

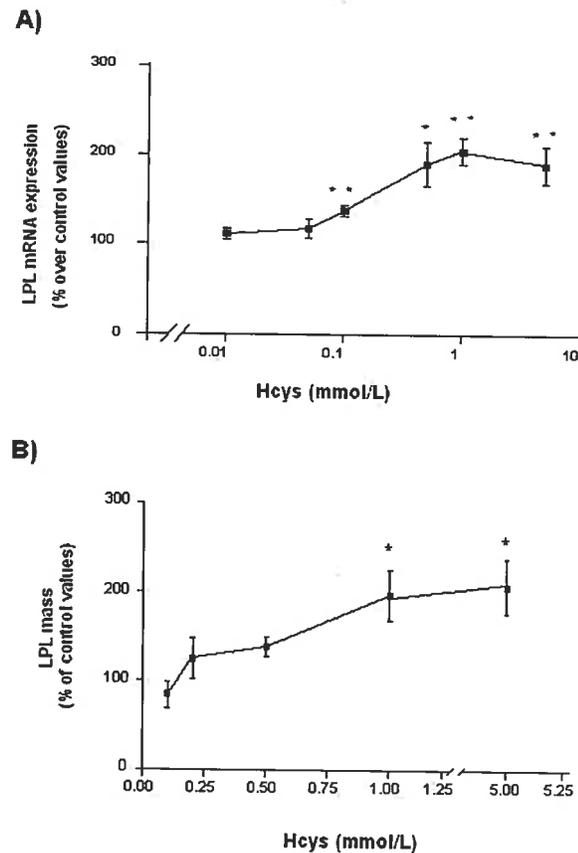


Fig.2. Dose-dependent effect of Hcys on Mo LPL mRNA levels and immunoreactive mass. Panel A: J774 cells were cultured in the presence of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 5 mmol/L Hcys for 60 minutes. At the end of this incubation period, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL and GAPDH mRNA expression. Levels of LPL mRNA were normalized to the levels of GAPDH mRNA. Panel B: J774 cells were cultured in the presence of 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 5 mmol/L Hcys for 24 hours. At the end of this incubation period, LPL immunoreactive mass was measured in the culture medium and normalized to total cell protein levels. Results represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs medium.

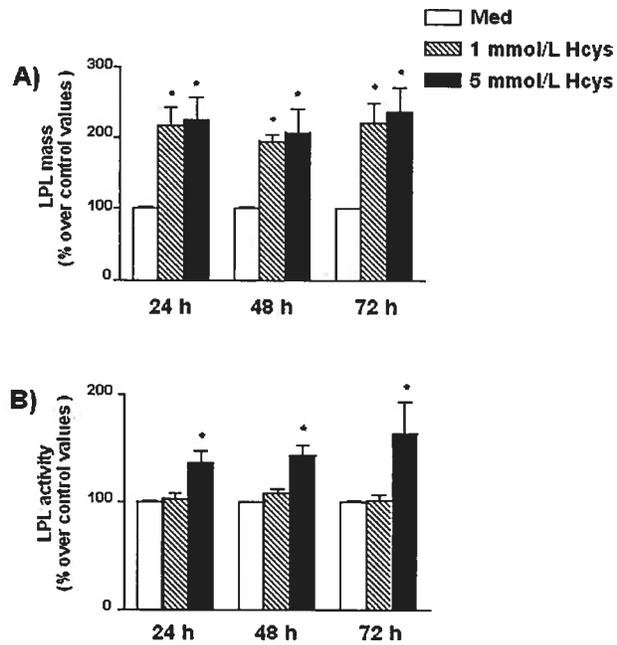


Fig.3. Effect of Hcys on Mo LPL immunoreactive mass (A) and activity (B). J774 cells were cultured in the presence of 1 or 5 mmol/L Hcys for 24, 48 and 72 hours. LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) were measured in the culture medium and normalized to total cell protein levels. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \*P<0.05 vs medium (Med).

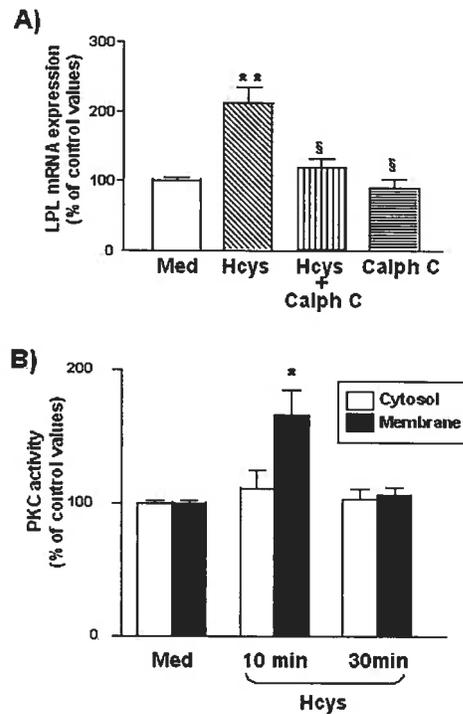


Fig.4. Effect of calphostin C on Hcys-stimulated Mo LPL mRNA levels (A). J774 cells were pre-treated for 30 minutes with calphostin C (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) prior to be exposed for 60 minutes to 1 mmol/L Hcys. At the end of this incubation period, cells were lysed, and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL and GAPDH mRNA expression. LPL mRNA levels were normalized to the levels of GAPDH mRNA (A). Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \*\* $P < 0.01$ , vs medium (Med); § $P < 0.05$ , vs Hcys-treated cells. Effect of Hcys on PKC activity (B). J774 cells were incubated with 1 mmol/L Hcys for 10 and 30 minutes. PKC activity in cytosolic and particulate fractions was determined as described in Methods. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P < 0.05$  vs medium (Med).

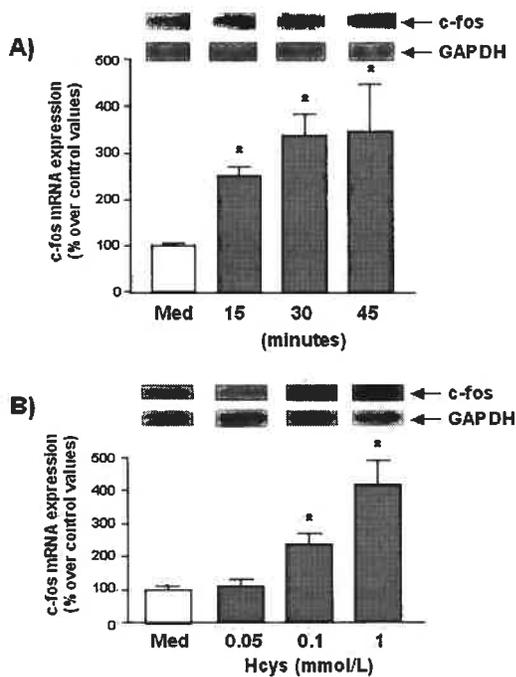


Fig.5. Effect of Hcys on Mo c-fos mRNA levels. J774 cells were cultured in the presence of 1 mmol/L Hcys for 15, 30 and 45 minutes (A) or with increasing concentration of Hcys for 45 minutes (B). At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for c-fos and GAPDH mRNA expression. Levels of c-fos mRNA were normalized to the levels of GAPDH mRNA. Results represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \*P<0.05 vs medium (Med).

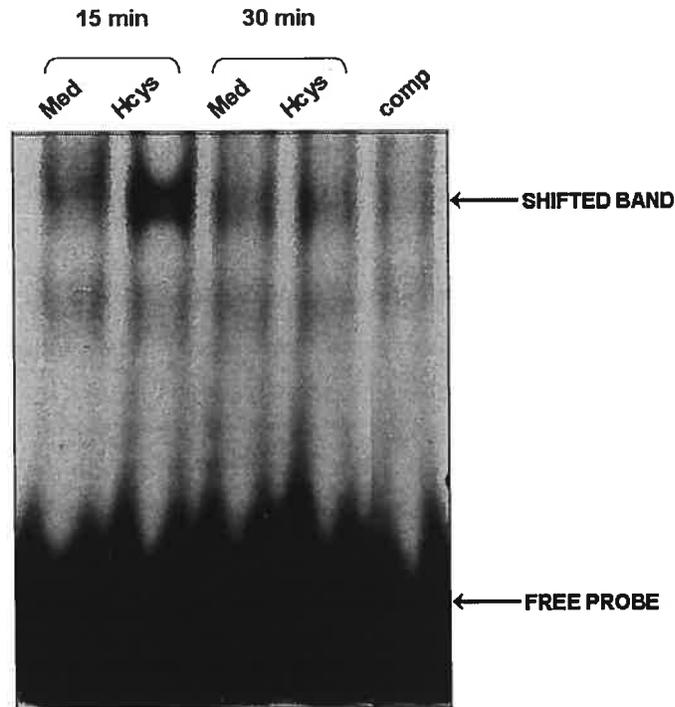


Fig.6. Effect of Hcys on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter. J774 cells were cultured in the presence of 1 mmol/L Hcys for 15 and 30 minutes. The nuclear proteins isolated from these cells were incubated with double-stranded AP-1 regulatory element of the LPL gene promoter. Retardation was assessed by gel electrophoresis in 4% polyacrylamide gel. Figure shows one representative experiment out of 4.

## DISCUSSION

Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular disease (1-5). Although Hcys has been implicated in many biological events associated with atherogenesis, the mechanism(s) by which this amino acid exerts its pro-atherogenic effects is (are) still not well known.

Our results demonstrate, for the first time, that Hcys stimulates Mo LPL secretion in vitro. This observation is relevant in light of recent studies showing that Mo LPL production in the arterial wall promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo (26-29). Our finding that Hcys induces in a similar extent LPL mRNA levels and LPL mass suggests that the stimulatory effect of Hcys on macrophage LPL secretion may, at least partly, involve transcriptional events. It is well known that the regulation of LPL gene expression is controlled by several cis- and trans-acting factors surrounding the LPL transcriptional start site (40,41). Induction of LPL gene expression by Hcys may theoretically involve different signaling pathways. Based on the presence of an AP-1 site in the regulatory sequence of the LPL gene and on the previously documented effect of Hcys on PKC and c-fos activation (12), one may suggest that increased AP-1 activity resulting from PKC-induced c-fos expression could mediate the stimulatory effect of Hcys on Mo LPL gene expression. Our findings that Hcys led to PKC activation in Mo and that specific PKC inhibitors totally abolished the induction of Mo LPL gene expression in response to Hcys clearly demonstrated that PKC activation is required for the stimulatory effect of Hcys on Mo LPL gene expression. Furthermore, our observations that Hcys induces parallel changes in Mo LPL and c-fos mRNA levels and that Hcys induces the binding of

nuclear proteins to the AP-1 sequence further suggest a role for c-fos in the transcriptional regulation of Mo LPL gene expression by Hcys. From these observations, one may postulate that one signaling event mediating the increase of the transcriptional rate of the LPL gene in response to Hcys involves the activation of PKC and the interaction of its well known target c-fos with the AP-1 sequence. Several lines of evidence indicate that PKC activates the mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathway and that induction of MAP kinase activity results subsequently in c-fos expression. Members of the MAP kinase family include the extracellular signal-regulated kinases (ERKs) 1 and 2, as well as the stress-induced kinases Jun N-terminal kinase (JNK) and p38. It has been demonstrated that Hcys activates the JNK signaling pathway in human endothelial cells (42) and stimulates ERK1 and 2 phosphorylation in smooth muscle cells and NIH/3T3 cells (43-45). Based on these findings and on the previously documented role of the MAP kinase pathway in the regulation of adipocyte LPL expression (46), it is tempting to speculate that PKC-dependent MAP kinase activation could mediate the upregulation of Mo LPL gene expression by Hcys. This question is especially relevant considering the close correlation between the reported biphasic activation of ERK, which rises 10 min and 4 hours after stimulation (47) and the presently documented Hcys-induced early and delayed stimulation of Mo LPL gene expression that we observed at 1 and 6 hours after Hcys exposure, respectively.

Besides c-fos, other transcription factors, such as peroxisome-proliferator activated receptors (PPAR) could mediate the upregulation of Mo LPL gene expression in response to Hcys. Indeed, evidence has been provided that PPARs regulate Mo LPL gene expression

(32,48) by binding to a peroxisome-proliferator response element (PPRE) present in the LPL promoter (49). Because Hcys (50), PKC (51,52) and MAP kinases (53-57) regulate the expression and/or activation of PPARs, these transcription factors may play a key role in the upregulation of Mo LPL gene expression in response to Hcys. Our preliminary observations showing that Hcys induces the binding of nuclear proteins to the PPRE of the LPL gene support this possibility.

Our results finally demonstrated that Hcys increases Mo LPL secretion. While the increment of LPL mass paralleled the induction in LPL mRNA, increase of LPL activity was not observed in cells exposed to 1 mmol/L Hcys and was well below to the reported elevation in the enzyme mRNA levels in Mo treated with 5 mmol/L Hcys. Because the antibody used to measure LPL mass recognized both active and inactive LPL, these findings suggest that Hcys induces the release of mostly inactive LPL. The complex post-translational processing of LPL allows to expect different sites for this modulation of LPL activity by Hcys. Further research will be necessary to exactly determine which steps of the process of LPL synthesis are target sites for the modulation of LPL activity by Hcys.

Recent data suggest that Hcys may be a risk factor for cardiovascular disease in the diabetic population. Plasma Hcys concentrations are elevated in patients with diabetes (58,59) and a relationship between hyperhomocysteinemia and increased risk of cardiovascular morbidity and mortality has been established in patients with type 2 diabetes (6-10). We previously demonstrated that Mo LPL, a pro-atherogenic protein, is increased in patients with type 2 diabetes (30) and that peripheral factors are, at least partly, responsible for this alteration (30-32). Our finding that Hcys increases Mo LPL secretion in vitro

suggests that Hcys may contribute to the induction of Mo LPL in human diabetes. One limitation of the present study is the supraphysiological Hcys concentrations needed to enhance Mo LPL expression in vitro. Indeed, we found that the DL-Hcys concentrations required to stimulate Mo LPL in the present study were more than 10 times those found in the plasma of patients with diabetes. Since the inactive D-isomer constitutes approximately 50% of the DL-Hcys, use of the L-isomer of Hcys exclusively could have lowered the Hcys concentration needed to elicit a biological response. It is also possible that concentrations of Hcys in the limited environment of the atherosclerotic plaque may be sufficient to favor the induction of Mo LPL in vivo. Because LPL exerts its pro-atherogenic effects through both its structural and catalytic properties (60-65), generation of increased amounts of LPL, even in its inactive form, may contribute to the accelerated atherosclerosis associated with diabetes.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that Hcys stimulates Mo LPL gene expression and secretion in vitro. Our data show that induction of Mo LPL mRNA expression by Hcys involves PKC activation and suggest a role of c-fos in the transcriptional regulation of Mo LPL expression. These results provide a new mechanism by which Hcys may promote atherosclerosis in human diabetes.

**REFERENCES**

1. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I : Hyperhomocysteinemia : an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324 : 1149-1155, 1991.
2. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, Lente FV, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, Kutner M, Topol EJ, Jacobsen DW : Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate : common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 92 : 2825-2830, 1995.
3. Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, Evans AE, Arveiler D, Cambien F, Upson BM : Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction : findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 126 : 27-34, 1996.
4. Loehrer FMT, Angst CP, Haefeli WE, Jordan PP, Ritz R, Fowler B : Low whole-blood S-Adenosylmethionine and correlation between 5-methyltetrahydrofolate and homocysteine in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 : 727-733, 1996.
5. Evans RW, Shaten J, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH : Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 1947-1953, 1997.
6. Okada E, Oida K, Tada H, Asazuma K, Eguchi K, Tohda G, Kosaka S, Takahashi S, Miyamori I : Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arteriosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22 : 484-490, 1999.

7. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Beks PJ, Mackaay AJ, Jakobs C, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CDA : Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 : 133-138, 1998.
8. Smulders YM, Rakic M, Slaats EH, Treskes M, Sijbrands EJ, Odekerken DA, Stehouwer CD, Silberbusch J : Fasting and post-methionine homocysteine levels in NIDDM. Determinants and correlations with retinopathy, albuminuria, and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 22 : 125-132, 1999.
9. Stehouwer CD, Gall MA, Hougaard P, Jakobs C, Parving HH : Plasma homocysteine concentration predicts mortality in non-insulin-dependent diabetic patients with and without albuminuria. *Kidney Int* 55 : 308-314, 1999.
10. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD : Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes : 5-year follow-up of the Hoorn Study. *Circulation* 101 : 1506-1511, 2000.
11. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME : Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine : a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 6369-6373, 1994.
12. Dalton ML, Gadson PF Jr, Wrenn RW, Rosenquist TH : Homocysteine signal cascade : production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myb in smooth muscle cells. *FASEB J* 11 : 703-711, 1997.

13. Durand P, Lussier-Cacan S, Blache D : Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J* 11 : 1157-1168, 1997.
14. Chait A, Iverius PH, Brunzell JD : Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 69 : 490-493, 1982.
15. Aviram M, Bierman EL, Chait A : Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase enhances uptake and cholesterol accumulation in cells. *J Biol Chem* 263 : 15416-15422, 1988.
16. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ : Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest* 90 : 1504-1512, 1992.
17. Stein O, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollander G, Halperin G, Stein Y : Can lipoprotein lipase be the culprit in cholesteryl ester accretion in smooth muscle cells in atheroma? *Atherosclerosis* 99 : 15-22, 1993.
18. Rutledge JC, Goldberg IJ : Lipoprotein lipase (LPL) affects low density lipoprotein (LDL) flux through vascular tissue : evidence that LPL increases LDL accumulation in vascular tissue. *J Lipid Res* 35 : 1152-1160, 1994.
19. Saxena U, Ferguson E, Bisgaier CL : Apolipoprotein E modulates low density lipoprotein retention by lipoprotein lipase anchored to the subendothelial matrix. *J Biol Chem* 268 : 14812-14819, 1993.
20. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D : Induction of tumor necrosis factor alpha gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 35 : 271-278, 1994.

21. Mamputu JC, Renier G : Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor-alpha expression and production. A process involving cell surface proteoglycans and protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 : 1405-1411, 1999.
22. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G : Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 38 : 1722-1729, 1997.
23. Saxena U, Kulkarni NM, Ferguson E, Newton RS : Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189 : 1653-1658, 1992.
24. Obunike JC, Paka S, Pillarisetti S, Goldberg IJ : Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 1414-1420, 1997.
25. Mamputu JC, Levesque L, Renier G : Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 2212-2219, 2000.
26. Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, Carter KJ, Semenkovich CF, Linton MF : Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest* 103 : 1697-1705, 1999.
27. Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MF : Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 275 : 26293-26299, 2000.

28. Semenkovich CF, Coleman T, Daugherty A : Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res* 39 : 1141-1151, 1998.
29. Van Eck M, Zimmerman R, Groot PH, Zechner R, Van Berckel TJ : Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : E53-62, 2000.
30. Sartippour MR, Renier G : Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes : role of peripheral factors. *Diabetes* 49 : 597-602, 2000.
31. Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St-Jacques P, Renier G : Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47 : 431-438, 1998.
32. Michaud SE, Renier G : Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase : potential role of PPARs. *Diabetes* 50 : 660-666, 2001.
33. Thomas PS : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 5201-5205, 1980.
34. Fried M, Crothers DM : Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9 : 6505-6525, 1981.
35. Zechner R, Newman TC, Steiner E, Breslow JL : The structure of the mouse lipoprotein lipase gene : a B1 repetitive element is inserted into the 3'-untranslated region of the mRNA. *Genomics* 11 : 62-76, 1991.

36. Hua XX, Enerbäck S, Hudson J, Youkhana K, Gimble JM : Cloning and characterization of the promoter of the murine lipoprotein lipase-encoding gene : structural and functional analysis. *Gene* 107 : 247-258, 1991.
37. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, Yamamoto A : A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 31 : 1911-1924, 1990.
38. Duque M, Graupner M, Stutz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F, Hermetter A : New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res* 37: 868-876, 1996.
39. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254, 1976.
40. Enerbäck S, Gimble JM : Lipoprotein lipase gene expression : physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169 : 107-125, 1993.
41. Bey L, Etienne J, Tse C, Brault D, Noe L, Raisonnier A, Arnault F, Hamilton MT, Galibert F : Cloning, sequencing and structural analysis of 976 base pairs of the promoter sequence for the rat lipoprotein lipase gene. Comparison with the mouse and human sequences. *Gene* 209 : 31-38, 1998.
42. Cai Y, Zhang C, Nawa T, Aso T, Tanaka M, Oshiro S, Ichijo H, Kitajima S : Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells :

- activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and promoter response element. *Blood* 96 : 2140-2148, 2000.
43. Brown JC, Rosenquist TH, Monaghan DT : ERK2 activation by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251 : 669-676, 1998.
44. Woo DK, Dudrick SJ, Sumpio BE : Homocysteine stimulates MAP kinase in bovine aortic smooth muscle cells. *Surgery* 128 : 59-66, 2000.
45. Shi SS, Day RM, Halpner AD, Blumberg JB, Suzuki YJ : Homocysteine and alpha-lipoic acid regulate p44/42 MAP kinase phosphorylation in NIH/3T3 cells. *Antioxid Redox Signal* 1 : 123-128, 1999.
46. Boney CM, Gruppuso PA, Faris RA, Frackelton AR Jr : The critical role of Shc in insulin-like growth factor-1-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol* 14 : 805-813, 2000.
47. Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J : Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors : correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* 6 : 845-854, 1992.
48. Sartippour MR, Renier G : Differential regulation of macrophage peroxisome proliferator-activated receptor expression by glucose. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in lipoprotein lipase gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 104-110, 2000.
49. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J : PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-

- specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15 : 5336-5348, 1996.
50. Brude IR, Finstad HS, Seljeflot I, Drevon CA, Solvoll K, Sandstad B, Hjermann I, Arnesen H, Nenseter MS : Plasma homocysteine concentration related to diet, endothelial function and mononuclear cell gene expression among male hyperlipidaemic smokers. *Eur J Clin Invest* 29 : 100-108, 1999.
51. Iwashima Y, Eto M, Horiuchi S, Sano H : Advanced glycation end product-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression in the cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264 : 441-448, 1999.
52. Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto AM Jr, Hajjar DP, Nicholson AC : Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* 41 : 688-696, 2000.
53. Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG, Meier CA : Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 274 : 10505-10510, 1999.
54. Camp HS, Tafuri SR : Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272 : 10811-10816, 1997.
55. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA : Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* 396 : 377-380, 1998.

56. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM : Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274 : 2100-2103, 1996.
57. Passilly P, Schohn H, Jannin B, Malki MC, Boscoboinik D, Dauca M, Latruffe N : Phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in rat Fao cells and stimulation by ciprofibrate. *Biochem Pharmacol* 58 : 1001-1008, 1999.
58. Chico A, Perez A, Cordoba A, Arcelus R, Carreras G, de Leiva A, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F : Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus : a new link between diabetic nephropathy and cardiovascular disease? *Diabetologia* 41 : 684-693, 1998.
59. Drzewoski J, Czupryniak L, Chwatko G, Bald E : Hyperhomocysteinemia in poorly controlled type 2 diabetes patients. *Diabetes Nutr Metab* 13 : 319-324, 2000.
60. Lindqvist P, Ostlund-Lindqvist AM, Witztum JL, Steinberg D, Little JA : The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J Biol Chem* 258 : 9086-9092, 1983.
61. Ishibashi S, Yamada N, Shimano H, Mori N, Mokuno H, Gotohda T, Kawakami M, Murase T, Takaku F : Apolipoprotein-E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 265: 3040-3047, 1990.
62. Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I : Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest* 90 : 2013-2021, 1992.

63. Tabas I, Li Y, Brocia RW, Xu SW, Swenson TL, Williams KJ : Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* 268 : 20419-20432, 1993.
64. Saxena U, Klein MG, Vanni TM, Goldberg IJ : Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J Clin Invest* 89 : 373-380, 1992.
65. Williams KJ, Tabas I : The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 551-561, 1995.

**II.3. Troisième article : *Advanced glycation end-products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression : involvement of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase.***



Journal of Lipid Research, 2004; June 21, [Epub ahead of print].

**Advanced glycation end-products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression: Involvement of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase.**

Marie-Claude Beauchamp, Sophie-Élise Michaud, Maryam Radimeh Sartippour and Geneviève Renier.

From the CHUM Research Centre, Notre-Dame Hospital, Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: AGE induce macrophage LPL expression.

Supplementary key words: glucose, oxidative stress, kinases, diabetes, atherosclerosis.

Reprint requests to:

Dr Geneviève Renier

Notre-Dame Hospital

Research Centre, 3<sup>rd</sup> floor, door Y-3622

1560 Sherbrooke Street East

Montreal, Quebec, H2L 4M1

Phone: (514) 890-8000 #26895

FAX: (514) 412-7661

E-MAIL: [genevieve.renier@umontreal.ca](mailto:genevieve.renier@umontreal.ca)

**ABSTRACT**

**Objective:** Recent evidences indicate that lipoprotein lipase (LPL) secreted by macrophages in the arterial wall promotes atherosclerosis. We have previously shown that macrophages of patients with type 2 diabetes overproduce LPL and that metabolic factors dysregulated in diabetes, including glucose, stimulate macrophage LPL secretion in vitro. In the present study, we determined the effect of advanced glycation end-products (AGE) on LPL expression by macrophages cultured in a high glucose environment and the molecular mechanisms underlying this effect. **Methods and Results:** Our results demonstrate that AGE potentiate the stimulatory effect of high glucose on murine and human macrophage LPL gene expression and secretion. Induction of macrophage LPL mRNA levels by AGE was identical to that elicited by physiologically relevant modified albumin (GlyBSA) and was inhibited by immunoneutralization of the AGE receptor (RAGE) as well as by antioxidants. Treatment of macrophages with AGE resulted in protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation. Inhibition of these kinases abolished the stimulatory effect of AGE on LPL mRNA levels. Finally, exposure of macrophages to AGE increased the binding of nuclear proteins to the activated protein-1 (AP-1) consensus sequence of the LPL promoter. This effect was inhibited by PKC and MAPK inhibitors. **Conclusion:** Overall, these results demonstrated for the first time, that AGE potentiate the stimulatory effect of high glucose on macrophage LPL expression and that this effect involves increased oxidative stress, and activation of PKC and MAPK. Further studies are required to evaluate the relevance of our in vitro findings to the accelerated atherosclerosis associated with human diabetes.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis is the leading cause of death in the Western world and the major complication of type 2 diabetes (1). Despite the well-documented association between diabetes and cardiovascular diseases, the reasons for the increased prevalence of atherosclerosis associated with type 2 diabetes are not well known.

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipid metabolism that is secreted by macrophages and smooth muscle cells (SMC) in the atherosclerotic lesion (2;3). Evidence indicates that LPL secreted by macrophages in the arterial intima is pro-atherogenic. Indeed, LPL acts as an atherogenic ligand that associates with lipoproteins, favoring thereby their uptake by vascular cells as well as their retention in the subendothelial matrix (4-6). This enzyme also stimulates the production of the pro-inflammatory cytokine, tumor necrosis factor alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) (7;8), increases monocyte adhesion to endothelial cells (9-11) and enhances the proliferation of vascular SMC (12). Finally, recent studies have demonstrated that macrophage LPL promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo (13-16).

We have previously shown that macrophages of type 2 diabetic patients overproduce LPL and that peripheral factors play a key role in this alteration (17). We have also recently proposed a role for glucose, fatty acids and homocysteine as macrophage LPL-stimulatory factors in human diabetes (18-20). Besides these factors, advanced glycation end-products (AGE) may play a role in the induction of macrophage LPL in human diabetes. Indeed, AGE accumulate in the plasma and tissues of type 2 diabetic patients (21) and exert pro-atherogenic effects (22;23). In the present study, we sought to determine the effect of AGE

on glucose-induced macrophage LPL expression. Our study demonstrates that AGE potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage LPL expression and that this effect involves oxidative stress, protein kinase C- (PKC) and mitogen-activated protein kinase- (MAPK) dependent pathways and activated protein-1 (AP-1) activation.

## METHODS

### Reagents

Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Wisent (St-Bruno, Qc, Canada). RPMI 1640 medium, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) and Trizol reagent were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Calphostin C, GF109203X, U0126 and PD98059 were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Affinity-purified polyclonal antibody against AGE receptor (RAGE) (M-20), CD36 (24) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-scavenger receptor-A (SR-A) (25) and anti-phospho-ERK 1/2 antibodies were obtained from Serotec (Raleigh, NC) and Cell Signaling Technology (Pickering, ON, Canada), respectively. Irrelevant mouse IgG<sub>1</sub> was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The anti-FC- $\gamma$  receptor II antibody was kindly provided by Dr M. Sarfati, University of Montreal, Montreal. Immunoglobulin- and fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was obtained from Sigma (St-Louis, MO). LY379196 was kindly provided by Eli Lilly (Indianapolis, IN). U0126, LY379196, PD98059 and GF109203X were dissolved in 0.02%, 0.03%, 0.2% and 0.08% dimethylsulfoxide (DMSO), respectively. DMSO used at these concentrations had no impact on LPL mRNA expression (data not shown).

### **Murine macrophages**

The J774 murine macrophage cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). J774 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and 100 µg/ml penicillin-streptomycin (Life Technologies).

### **Human macrophages**

Human monocytes were isolated as previously described (26). Differentiation of monocytes into monocyte-derived macrophages was achieved by culturing monocytes in RPMI 1640 medium supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin and 20% (vol/vol) autologous serum. The cells were incubated for 8 days at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. The culture medium was changed at days 4 and 8.

### **Preparation of AGEs**

Immunoglobulin- and fatty acid-free BSA (low endotoxin) was subjected to nonenzymatic glycation by incubation with 0.5 mol/L (AGE) or 50 mmol/L glucose (GlyBSA) in 0.4 mol/L sodium phosphate buffer containing 0.5 mmol/L EDTA. The solutions were sterile-filtered by passage through a 0.2µm filter and then incubated at 37°C for 6 weeks under aerobic conditions. Non-glycated albumin was obtained by incubating BSA in the same reaction mixture in the absence of glucose. At the end of the incubation period, samples were extensively dialyzed against 10 mmol/L phosphate-buffered salt solution (PBS), pH 7.4 at 4°C to remove unreacted glucose. Presence of AGE was confirmed by the typical absorption and fluorescent spectra patterns of these proteins (27-28). The intensity of fluorescence of AGE at excitation of 370 nm and emission of 440 nm was increased about 3- and 6-fold in comparison with GlyBSA and non glycated BSA, respectively. Endotoxin

content of the BSA and AGE preparations (200  $\mu\text{g/ml}$ ) was determined by the *Limulus ameobocyte lysate assay* (Sigma) and was consistently found to be lower than 0.003 ng/ml. Cell viability as assessed by Trypan Blue exclusion was unaffected by BSA or AGE (200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Cell viability (% of control values): BSA:  $91.7 \pm 1.7$ ; AGE:  $93.2 \pm 1.5$ )).

### **Analysis of LPL mRNA expression**

#### *RT-PCR*

Total RNA for use in the PCR reaction was extracted from human macrophages by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski and Sacchi (29), precipitated and resuspended in diethyl pyrocarbonate water. cDNA was synthesized from RNA by incubating 1  $\mu\text{g}$  of total cellular RNA with 0.1  $\mu\text{g}$  oligodT (Pharmacia, Piscataway, NJ) for 5 min at 98°C then by incubating the mixture with reverse transcription buffer for 60 min at 37°C. The cDNA obtained was amplified and analyzed as described previously (17).

#### *Northern blot*

Six million J774 macrophages were plated in plastic petri dishes (100 $\times$ 20mm) (Falcon, Lincoln Park, NJ). After treatment, cells were lysed with Trizol reagent. Total RNA was isolated and separated on a 1.2% agarose gel. The blots were prehybridized, then mRNA expression was analyzed by hybridization with [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP-labeled LPL and S28 cDNA probes. Hybridization was detected by autoradiography with Kodak X-Omat-AR films (Rochester, NY). mRNA expression was quantified by high resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000, Packard Instruments, Meriden, CT).

### **Determination of human LPL immunoreactive mass and activity**

One hour before the end of the incubation period, 50 U/ml heparin was added to the medium. The amount of LPL immunoreactive mass in the supernatants was measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the Markit-F LPL kit (Dainippon, Pharmaceutical, Osaka, Japan) (30). Extracellular LPL activity was determined using the Confluolip kit (Progen, American research products, USA) (31). LPL mass and activity values were normalized to the levels of total cell proteins.

### **Measurement of PKC activity**

PKC activity was measured in cytosolic and particulate fractions of the cells using myelin basic protein (MBP) as kinase substrate as previously described (20). PKC activity was normalized to the levels of total cell proteins. Data were expressed as percentages considering the control as 100% activity.

### **Western blot analysis**

Protein extracts (10 $\mu$ g) were applied to 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Non-specific binding was blocked with 5% non-fat dry milk for 1 hour at room temperature. After washing with PBS-Tween 0.1%, blots were incubated overnight with either an anti-ERK 1/2 or an anti-phospho-ERK 1/2 antibody. After further wash, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1/5000). Antigen detection was performed with an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Baie d'Urfé, QC). Protein

expression was quantified by high resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000, Packard Instruments, Meriden, CT).

#### **Electrophoretic mobility shift assay**

The isolation of the nuclei and DNA binding assay were performed as described previously (20).

#### **DNA probes**

The cDNA probe for detection of murine LPL was prepared by the PCR technique. cDNA was obtained from total RNA using a reverse transcription reaction. Two synthetic primers spanning bases 255-287 and 1117-1149 of the LPL cDNA were used to enzymatically amplify a 894-bp region of the LPL probe. The cDNA probes for murine S28 was purchased from ATCC. A 20-mer double-stranded oligonucleotide (5'-GGGCACCTGACTAAGGCCAG-3'; 5'-TGTGCTGGCCTTAGTCAGGT-3') containing the consensus sequence for the AP-1 responsive element of the murine LPL gene promoter (32) was synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer. After annealing, the double-stranded oligonucleotide was labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP by using the Boehringer Mannheim 5' end-labeling kit (Indianapolis, IN).

#### **Determination of total protein concentrations**

Total protein content was measured according to the Bradford method (33) using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

#### **Statistical analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. For single comparison, data were analyzed by the student *t*-test. For multiple comparisons, data were analyzed by one-way analysis of

variance followed by the Student-Newman-Keuls test or the Dunn's method .  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### **Effect of AGE on LPL mRNA levels and secretion by J774 macrophages.**

J774 murine macrophages were incubated for 24 or 72 hours in culture medium containing low (5.6 mmol/l) or high (20 mmol/l) glucose concentrations in the presence or absence of BSA or AGE. At the end of the incubation period, LPL mRNA levels and secretion were measured. Treatment of J774 macrophages for 24 hours with BSA did not alter LPL mRNA levels regardless of the experimental conditions used (Fig.1A). AGE did not affect the levels of LPL mRNA in J774 macrophages cultured in a low glucose medium, whereas both AGE and GlyBSA (200 µg/ml) increased LPL mRNA levels in macrophages cultured in a high glucose environment (Fig.1A). The effect of AGE on LPL mRNA levels was dose-dependent with maximal effect at a concentration of 200 µg/ml (LPL mRNA levels (% of control values): AGE (50 µg/ml):  $108.6 \pm 9.9$ ; AGE (100 µg/ml):  $137.5 \pm 10.6$ ,  $P < 0.05$ ; AGE (200 µg/ml):  $162.1 \pm 10.1$ ,  $P < 0.01$ ). No modulation of LPL mRNA levels was observed when cells were treated with AGE in the presence of 20 mmol/l D-mannitol (data not shown). Recovery of enhanced amounts of LPL immunoreactive mass in the supernatants of cells treated with AGE for 72 hours reflected the increase in macrophage LPL mRNA expression in response to AGE (Fig.1B). AGE did not change LPL secretion by macrophages exposed for 24 or 48 hours to a high glucose environment (data not shown). In contrast, no effect of AGE on extracellular LPL activity was observed (data not shown).

**Effect of AGE on LPL mRNA levels and secretion by human macrophages.**

To assess the physiological relevance of our findings in J774 macrophages, we next determined the effect of AGE on LPL gene expression and secretion by human macrophages cultured for 24 to 72 hours in the presence of 5.6 or 20 mmol/l glucose. As documented in J774 macrophages, AGE did not change LPL mRNA expression in human macrophages exposed for 24 hours to a low glucose environment (data not shown). In contrast, an increase in LPL mRNA expression was found when human macrophages were incubated for 24 hours with AGE or GlyBSA (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the presence of 20 mmol/l glucose (Fig.2A). A significant ( $P=0.03$ ) stimulatory effect of AGE on LPL immunoreactive mass was observed in human macrophages exposed to high glucose for 72 hours (Fig.2B). Levels of LPL activity secreted by AGE-treated macrophages remained unchanged regardless of the experimental conditions applied (data not shown).

**Role of AGE receptors in AGE-induced macrophage LPL gene expression.**

To determine the nature of the AGE receptors mediating the stimulatory effect of AGE on macrophage LPL expression, J774 cells cultured in a high glucose medium were pretreated for one hour with anti-RAGE, SR-A or CD36 antibodies (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) prior being exposed to BSA or AGE (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Immunoneutralization of RAGE totally abolished AGE-induced macrophage LPL gene expression (Fig.3). In contrast, neither anti-SRA and anti-CD36, nor irrelevant IgG<sub>1</sub> and anti-FC- $\gamma$  receptor II antibodies did significantly reduce LPL gene expression (data not shown). Similar inhibitory effect of RAGE antibody was observed in human macrophages (LPL mRNA levels (% of control values): AGE:  $174.9 \pm 24.4$ ; RAGE+AGE:  $77.0 \pm 32.91$ ,  $P<0.05$  vs AGE).

**Effect of antioxidants on AGE-induced macrophage LPL mRNA levels.**

To assess the role of oxidative stress as mediator of the stimulatory effect of AGE on LPL mRNA levels, J774 cells were pretreated for 1 hour with the antioxidants, DMSO (0.5%) or N-acetylcysteine (NAC; 10 mmol/l), then exposed to AGE for 24 hours. As shown in Fig.4, pretreatment of the cells with these agents negated the stimulatory effect of AGE on LPL mRNA expression. Similar inhibitory effect of these antioxidants was noted in human macrophages (LPL mRNA levels (% of control values): AGE:  $174.9 \pm 24.4$ ; NAC+AGE:  $88.3 \pm 31.5$ ,  $P < 0.05$  vs AGE; DMSO+AGE:  $63.5 \pm 14.6$ ,  $P < 0.01$  vs AGE).

**Role of PKC and MAPK as intracellular signaling pathways mediating the stimulatory effect of AGE on macrophage LPL mRNA expression.**

To evaluate the role for PKC and MAPK in AGE-induced LPL gene expression, we first measured PKC and ERK 1/2 phosphorylation in J774 macrophages treated for up to 30 minutes with AGE. As shown in Fig 5A, treatment of J774 macrophages with AGE increased by 1.5-fold membrane PKC activity in these cells. This effect was totally reversed by pre-incubation of the cells with NAC (Fig.5A). AGE also induced ERK 1/2 activation as assessed by immunoblot analysis of phosphospecific ERK 1/2 (Fig.5B). Maximal effect of AGE on ERK 1/2 activation was found at 30 minutes (data not shown). AGE-induced ERK 1/2 activation was inhibited by calphostin C, LY379196, NAC, U0126 and PD98059 (Fig.5B).

To further investigate the involvement of PKC and MAPK in AGE-induced LPL gene expression, J774 and human macrophages were pre-treated with the specific PKC and MAPK inhibitors, calphostin C (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) and PD98059 (100  $\mu\text{mol/l}$ ), respectively. These

compounds inhibited the induction of the LPL gene by AGE in both murine (Fig.6) and human cells (human macrophage LPL mRNA levels (% of control values): AGE:  $174.9 \pm 24.4$ ; calphostin C +AGE:  $83.67 \pm 13.04$ , PD98059+AGE:  $89.33 \pm 14.68$ ,  $P < 0.05$  vs AGE). Similar effect was noted when J774 macrophages were incubated with the classical PKC inhibitor, GF109203X, and the MAPK inhibitor, U0126 (data not shown). To determine the role of PKC- $\beta$  in the regulation of macrophage LPL gene expression by AGE, J774 cells were pretreated with the specific PKC- $\beta$  inhibitor, LY379196 (30 nmol/l) before being exposed to AGE. As shown in Fig.6, this compound totally inhibited AGE-induced LPL mRNA expression.

**Effect of AGE on the binding of nuclear proteins to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter.**

We next determined whether incubation of J774 cells in the presence of AGE might induce changes at the level of LPL gene promoter binding proteins. We found that a 16-hours exposure of J774 cells to AGE led to an increase in the binding of nuclear proteins to the AP-1 consensus sequence of the LPL promoter (Fig.7). This binding complex was specifically competed in the presence of a 1000-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide (comp). To assess the role of PKC and ERK 1/2 in this effect, the effect of calphostin C, PD98059 and LY379196 on AGE-induced AP-1 activation was further evaluated. As shown in Fig.7, these compounds inhibited the enhanced nuclear proteins binding to AP-1. These results suggest that AP-1 binding to LPL promoter occurs downstream of PKC and MAPK activation in response to AGEs.

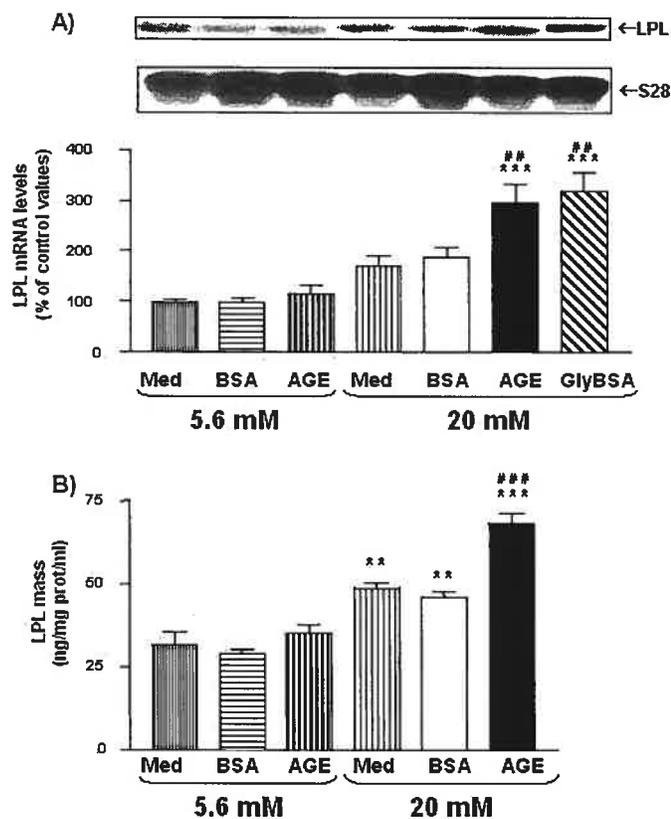


Fig.1. Effect of AGE on LPL mRNA levels and secretion in J774 macrophages. J774 cells were cultured for 24 hours (LPL mRNA) or 72 hours (LPL mass) in 5.6 or 20 mmol/l glucose in the presence of BSA, AGE or GlyBSA (200  $\mu$ g/ml). At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot for LPL and S28 mRNA expression. LPL mRNA levels were normalized to the levels of S28 mRNA. \*\*\*P<0.001 vs medium 5.6 mM, ## P<0.01 vs medium 20 mM (A). LPL mass was measured in supernatants and normalized to the levels of total cell proteins. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs medium 5.6 mM, ### P<0.001 vs medium 20 mM (B).

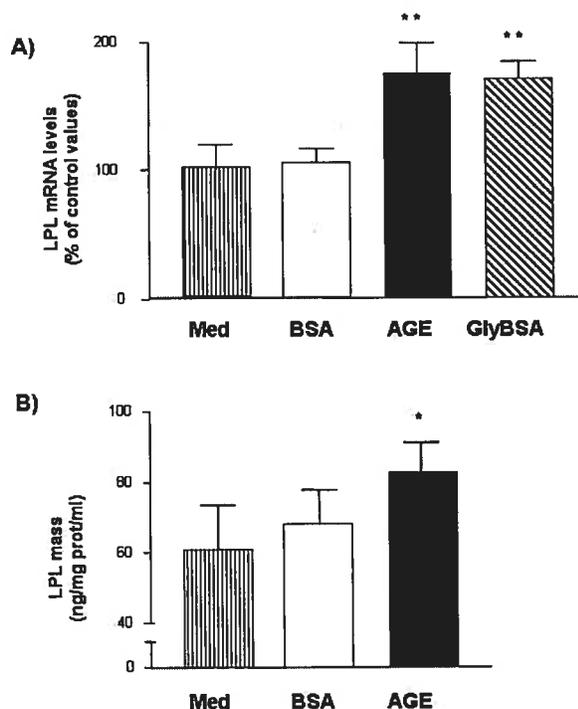


Fig.2. Effect of AGE on LPL mRNA levels and secretion in human monocyte-derived macrophages. Human monocyte-derived macrophages were cultured for 24 hours (LPL mRNA) or 72 hours (LPL mass) in 20 mmol/l glucose in the presence of BSA, AGE or GlyBSA (200  $\mu$ g/ml). At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted. LPL and GAPDH mRNA expression was analyzed by reverse transcription-PCR. LPL mRNA levels were normalized to the levels of GAPDH mRNA (A). LPL mass was measured in supernatants and normalized to the levels of total cell proteins (B). Results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs medium.

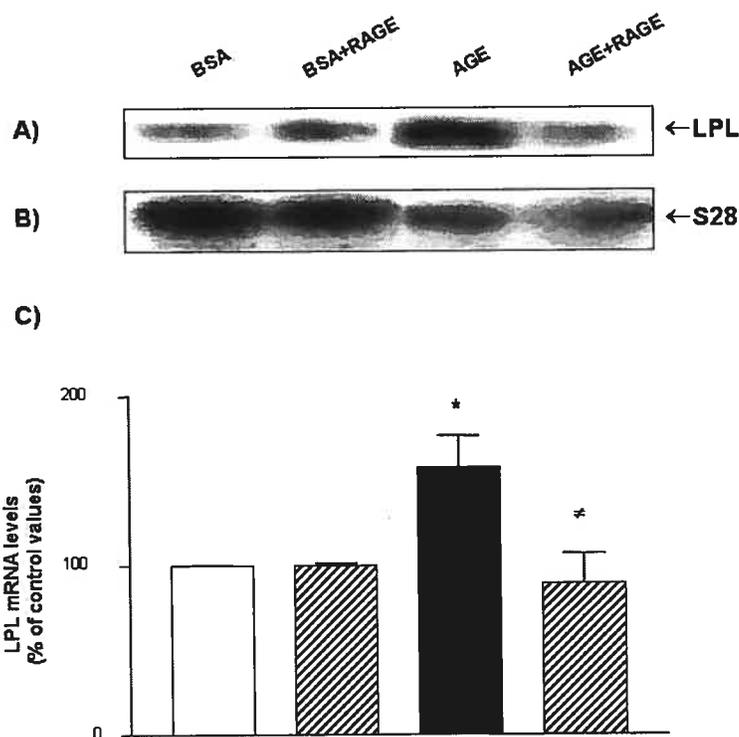


Fig.3. Role of AGE receptor on AGE-induced macrophage LPL mRNA expression. J774 cells were preincubated for one hour with antibody against RAGE (1  $\mu\text{g/ml}$ ), then incubated for 24 hours in the presence of 20 mmol/l glucose with BSA or AGE (200  $\mu\text{g/ml}$ ). At the end of these incubation periods, total cellular RNA was extracted and analyzed by Northern blot for LPL (A) and S28 (B) mRNA expression. LPL mRNA levels were normalized to the levels of S28 mRNA (C). Results represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs BSA, \* $P < 0.05$  vs AGE.

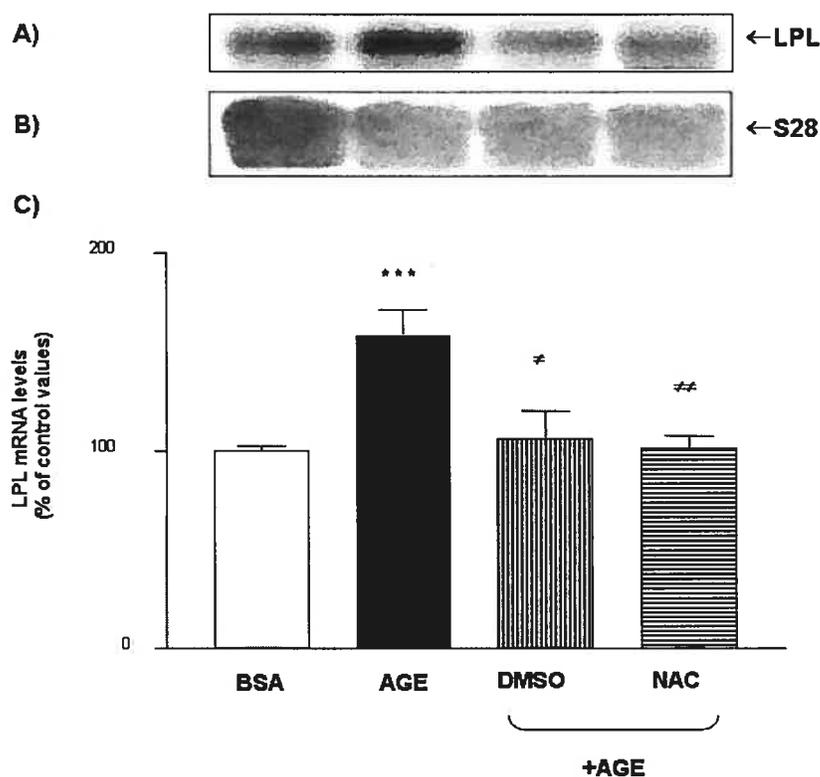


Fig.4. Effect of antioxidants on AGE-induced macrophage LPL mRNA expression. J774 cells were pre-incubated in the presence of 0.5% DMSO or 10 mmol/l NAC for 1 hour, then cultured for 24 hours in 20 mmol/l glucose in the presence of BSA or AGE (200  $\mu$ g/ml). At the end of these incubation periods, total cellular RNA was extracted and analyzed by Northern blot for LPL (A) and S28 (B) mRNA expression. LPL mRNA levels were normalized to the levels of S28 mRNA (C). Results represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \*\*\* $P$ <0.001 vs BSA, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs AGE.

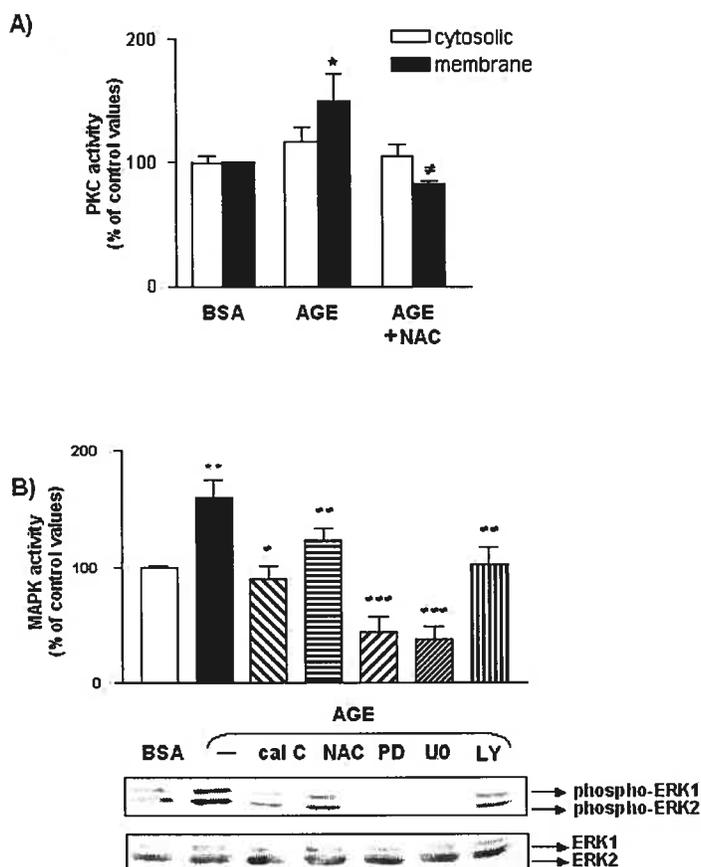


Fig.5. Effect of AGE on PKC and MAPK activation in J774 macrophages. J774 cells were pre-treated or not with NAC (10 mmol/l), calphostin C (cal C) (0.1  $\mu$ g/ml), PD98059 (PD) (100 $\mu$ mol/l), U0126 (U0) (20  $\mu$ mol/l), LY379196 (LY) (30 nmol/l) for 1 hour then incubated with 20 mmol/l glucose in the presence of BSA or AGE (200  $\mu$ g/ml) for 30 min. **A.** PKC activity in cytosolic and particulate fractions was determined as described in Methods. Results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \* $P$ <0.05 vs BSA, \* $P$ <0.05 vs AGE. **B.** Phosphorylation was assessed by Western blot using phospho-specific ERK 1/2 antibody or specific ERK 1/2 antibody. Representative blot out of 4 is shown. \*\* $P$ <0.01 vs BSA, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs AGE.

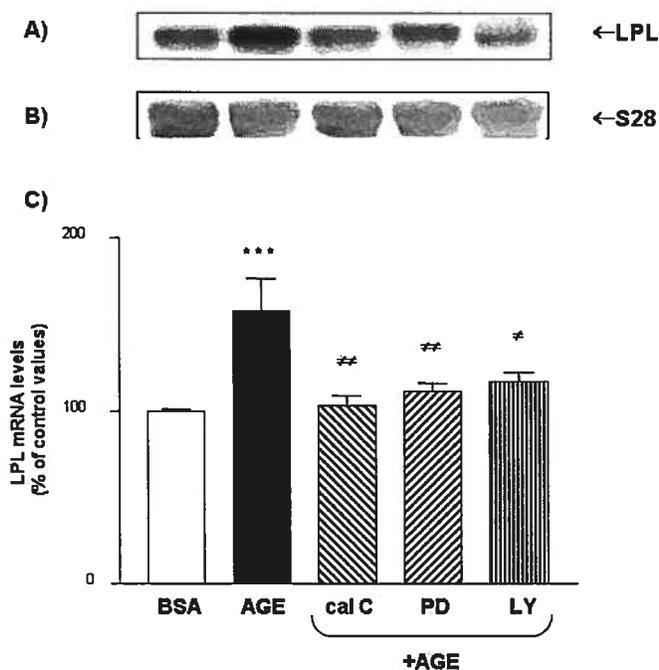


Fig.6. Effect of PKC and ERK 1/2 inhibitors on AGE-induced macrophage LPL mRNA expression. J774 cells were pre-incubated for 1 hour with the PKC inhibitors, calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) and LY379196 (LY) (30  $\text{nmol/L}$ ), or with the ERK 1/2 inhibitor, PD98059 (PD) (100  $\mu\text{mol/l}$ ), then cultured for 24 hours in 20  $\text{mmol/l}$  glucose in the presence of BSA or AGE (200  $\mu\text{g/ml}$ ). At the end of these incubation periods, total cellular RNA was extracted and LPL (A) and S28 (B) mRNA expression was analyzed by Northern blot. LPL mRNA levels were normalized to the levels of S28 mRNA (C). Results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*\*\* $P < 0.01$  vs BSA, \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs AGE.

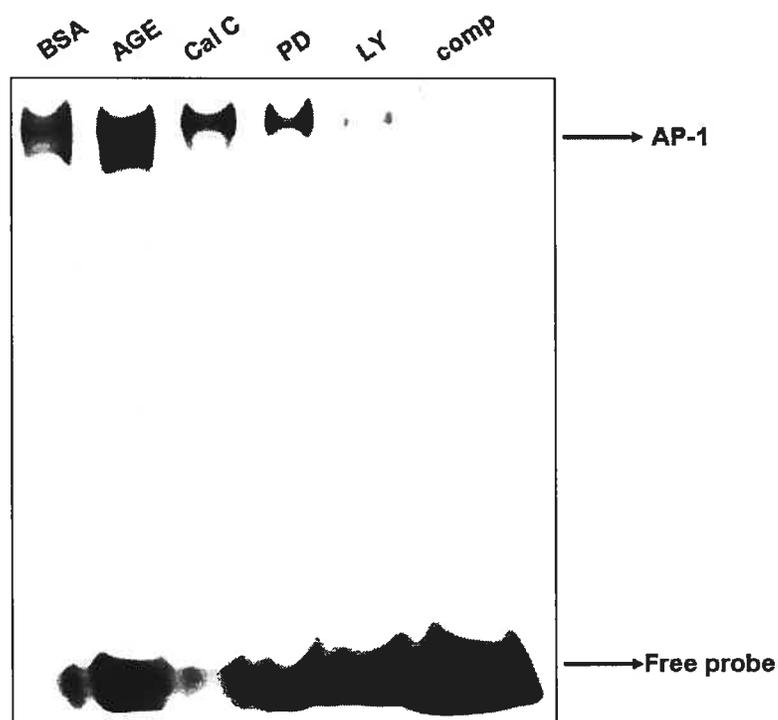


Fig.7. Effect of AGE on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter. J774 cells were pre-incubated for one hour with the PKC inhibitors, calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and LY379196 (LY) (30 nmol/L), or with ERK 1/2 inhibitor PD98059 (PD) (100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), then cultured for 16 hours in 20 mmol/l glucose in the presence of BSA or AGE (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The nuclear proteins isolated from these cells were incubated with double-stranded AP-1 regulatory element of the LPL gene promoter. Retardation was assessed by gel electrophoresis. Figure shows one representative experiment out of 3.

## DISCUSSION

Previous studies have demonstrated that interaction of AGE with AGE receptors expressed on macrophages induces several biological events linked to the development of vascular lesions (34-36). Among these, increased monokine secretion has been documented in AGE-treated human monocytes and macrophages (34;36). Interestingly, it has also been reported that these compounds act synergistically with high glucose to enhance human monocyte TNF- $\alpha$  and interleukin-6 production (36). In accordance with these data, our study demonstrates that AGE, although ineffective per se, act synergistically with glucose to induce macrophage LPL secretion. These results further emphasize the critical role of AGE as key regulators of macrophage function.

On the basis of our previous results showing that high glucose stimulates macrophage LPL at the transcriptional level, we evaluated whether AGE effect on macrophage LPL secretion may involve transcriptional events. Our findings that changes in LPL mRNA levels in AGE-treated macrophages correlate with changes in LPL secretion support this possibility. Among the signaling pathways initiated by AGE interaction with vascular cells, induction of oxidative stress and activation of kinases have captured considerable interest (37-39). Evidence that oxidant stress and PKC are involved in the regulation of macrophage LPL (40-42) suggests a role for these events in the induction of macrophage LPL in response to AGE. Our results which demonstrate that antioxidants inhibit AGE-induced macrophage LPL gene expression indicate that oxidative stress evoked by AGE-macrophage interaction is involved in this process.

Recent data have demonstrated that AGE activate PKC and MAPK in mesangial cells and human monocytes, respectively (37;39). In accordance with these results, we found that AGE induce PKC activity in macrophages and that this event is required for the transcriptional effect of AGE on macrophage LPL gene expression. Evidence that the PKC $\beta$  isoform-specific inhibitor, LY379196, inhibits AGE-induced LPL mRNA levels further indicates a role for PKC $\beta$  in this effect. This finding together with the previously documented effect of AGE on PKC $\beta$  activation in vascular renal cells (37) emphasizes the critical role of this PKC isoform in diabetic vascular complications (43;44). The requirement of high glucose levels to see increased LPL by AGE may reside in the differential kinetic pattern of PKC activation in response to glucose and AGE. Indeed, in contrast to the rapid and transient activation of PKC that we reported in AGE-treated macrophages, we found that PKC activation in high glucose-treated macrophages was evident only after several hours (unpublished observations). From these data, it is tempting to speculate that AGE, although ineffective per se, may induce macrophage LPL, by speeding-up PKC activation in high glucose-treated macrophages. Because oxidative stress induces PKC (45), activation of PKC in AGE-treated macrophages may result from the generation of reactive oxygen species. This possibility is supported by our results showing that NAC totally suppresses PKC activation in AGE-treated macrophages. Among the major downstream targets of PKC in human diabetes, MAPK are likely to constitute an important point of regulation of vascular cells. Indeed, it has been demonstrated that co-activation of PKC and MAPK occurs in cells maintained in high glucose (46) and that PKC can activate MAPK (47;49). Furthermore, evidence has been provided that AGE activate

ERK in human monocytes (39) and that MAPK isoforms constitute downstream effectors of AGE-induced PKC activation in smooth muscle cells (49). Our study clearly demonstrates that AGE activate ERK 1/2 in macrophages and that this signaling pathway plays a critical role in AGE-induced macrophage LPL expression. Our results showing that induction of ERK activity by AGE is inhibited by calphostin C further support the notion that MAPK act as intermediate molecules transducing signal from PKC to macrophage LPL. Taken together, these results suggest that sequential activation of PKC and MAPK by oxidant stress mediates the stimulatory effect of AGE on macrophage LPL expression.

Recent studies have demonstrated that AGE increase the activities of two major transcription factors involved in the regulation of the macrophage LPL gene, namely AP-1 (50;51) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (52). Evidence that AGE activate PKC and MAPK in macrophages and that these kinases regulate the activities of AP-1 (53;54) and PPARs (55) suggests a potential role of these transcription factors as mediators of the transcriptional effect of AGE on macrophage LPL gene expression. Our results which demonstrate that AGE enhance the binding of nuclear proteins to the AP-1 sequence of the LPL gene and that this effect is abrogated by PKC and MAPK inhibitors support this hypothesis.

Binding and uptake of AGE proteins by macrophages is mediated by various receptors, including SR-A, CD36 and RAGE (56-58). Evidence that blockade of RAGE, but not of other AGE receptors, inhibits the stimulatory effect of AGE on LPL, indicates that AGE operate via this receptor to induce macrophage LPL.

While potentiation of high glucose effects by AGE may be relevant for diabetic vascular complications, the significance of our observations to atherogenesis remains unclear. Given the very significant stimulation of LPL expression by high glucose alone that we previously documented at 96 and 120 hours (18), the relatively modest effect of AGE on glucose-induced LPL mass at 72 hours may not have much physiological consequence. It remains also to evaluate whether AGE isolated from diabetic sources at concentrations found in the arterial wall produce similar effect. Finally, lack of AGE effect on macrophage LPL activity may lessen the relevance of our data to atherogenesis. Although evidence that non-catalytically active LPL promotes atherogenesis partly addresses this issue (59), further studies are clearly needed to evaluate the physiological consequences of the AGE effect that we reported herein. In conclusion, this study demonstrates that AGE potentiate the stimulatory effect of high glucose on macrophage LPL expression. This effect is mediated through oxidative stress and requires PKC and MAPK activation.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Association Diabète Québec and the Heart and Stroke Foundation of Canada. The authors thank Eli Lilly for providing LY379196.

**REFERENCES**

1. Savage PJ. 1998. Treatment of diabetes mellitus to reduce its chronic cardiovascular complications. *Curr Opin Cardiol.* **13**:131-138.
2. O'Brien K.D., D. Gordon, S. Deeb, M. Ferguson, A. Chait. 1992. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* **89**:1544-1550.
3. Yla-Herttuala S., B.A. Lipton, M.E. Rosenfeld, I.J. Goldberg, D. Steinberg, J.L. Witztum. 1991. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:10143-10147.
4. Eisenberg S., E. Sehayek, T. Olivecrona, I. Vlodavsky. 1992. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest.* **90**:2013-2021.
5. Saxena U., M.G. Klein, T.M. Vanni, I.J. Goldberg. 1992. Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J Clin Invest.* **89**:373-380.
6. Olivecrona G., T. Olivecrona. 1995. Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **6**:291-305.
7. Renier G., E. Skamene, J.B. DeSanctis, D. Radzioch. 1994. Induction of tumor necrosis factor alpha gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* **35**:271-278.
8. Mamputu J.C., G. Renier. 1999. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor

- necrosis factor-alpha expression and production: a process involving cell surface proteoglycans and protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**:1405-1411.
9. Mamputu J.C., A.C. Desfaits, G. Renier. 1997. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* **38**:1722-1729.
  10. Saxena U., N.M. Kulkarni, E. Ferguson, R.S. Newton. 1992. Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **189**:1653-1658.
  11. Obunike J.C., S. Paka, S. Pillarisetti, I.J. Goldberg. 1997. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**:1414-1420.
  12. Mamputu J.C., L. Levesque, G. Renier. 2000. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**:2212-2219.
  13. Babaev V.R., S. Fazio, L.A. Gleaves, K.J. Carter, C.F. Semenkovich, M.F. Linton. 1999. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest.* **103**:1697-1705.
  14. Babaev V.R., M.B. Patel, C.F. Semenkovich, S. Fazio, M.F. Linton. 2000. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem.* **275**:26293-26299.
  15. Semenkovich C.F., T. Coleman, A. Daugherty. 1998. Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res.* **39**:1141-1151.

16. Van Eck M., R. Zimmermann, P.H. Groot, R. Zechner, T.J. van Berkel. 2000. Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**:E53-E62.
17. Sartippour M.R., G. Renier. 2000. Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: role of peripheral factors. *Diabetes* **49**:597-602.
18. Sartippour M.R., A. Lambert, M. Laframboise, P. St Jacques, G. Renier. 1998. Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* **47**:431-438.
19. Michaud S.E., G. Renier. 2001. Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes* **50**:660-666.
20. Beauchamp M-C., G. Renier. 2002. Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-Fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes* **51**:1180-1187.
21. Wautier J.L., P.J. Guillausseau. 1998. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vasc Med.* **3**:131-137.
22. Kume S., M. Takeya, T. Mori, N. Araki, H. Suzuki, S. Horiuchi, T. Kodama, Y. Miyauchi, K. Takahashi. 1995. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol.* **147**:654-667.
23. Park L., K.G. Raman, K.J. Lee, Y. Lu, L.J. Jr. Ferran, W.S. Chow, D. Stern, A.M. Schmidt. 1998. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* **4**:1025-1031.

24. Kuniyasu A., S. Hayashi, H. Nakayama. 2002. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**:319-323.
25. Chao S.K., R.F. Hamilton, J.C. Pfau, A. Holian. 2001. Cell surface regulation of silica-induced apoptosis by the SR-A scavenger receptor in a murine lung macrophage cell line (MH-S). *Toxicol Appl Pharmacol.* **174**:10-16.
26. Mentzer S.J., P.M. Guyre, S.J. Burakoff, D.V. Faller. 1986. Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol.* **101**:312-319.
27. Pongor S., P.C. Ulrich, F.A. Bencsath, A. Cerami. 1984. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**:2684-2688.
28. Yamagishi S.I., H. Yonekura, Y. Yamamoto, K. Katsuno, F. Sato, I. Mita, H. Ooka, N. Satozawa, T. Kawakami, M. Nomura, H. Yamamoto. 1997. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. *J Biol Chem.* **272**: 8723-8730.
29. Chomczynski P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**:156-159.
30. Ikeda Y., A. Takagi, Y. Ohkaru, K. Nogi, T. Iwanaga, S. Kurooka, A. Yamamoto. 1990. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res.* **31**:1911-1924.

31. Duque M., M. Graupner, H. Stutz, I. Wicher, R. Zechner, F. Paltauf, A. Hermetter. 1996. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res.* **37**:868-876.
32. Hua X.X., S. Enerback, J. Hudson, K. Youkhana, J.M. Gimble. 1991. Cloning and characterization of the promoter of the murine lipoprotein lipase-encoding gene: structural and functional analysis. *Gene.* **107**:247-258.
33. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254.
34. Vlassara H., M. Brownlee, K.R. Manogue, C.A. Dinarello, A. Pasagian. 1988. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science.* **240**:1546-1548.
35. Vlassara H. 1994. Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med.* **124**:19-30.
36. Morohoshi M., K. Fujisawa, I. Uchimura, F. Numano. 1995. The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* **748**:562-570.
37. Scivittaro V., M.B. Ganz, M.F. Weiss. 2000. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* **278**:F676-F683.

38. Yan S.D., A.M. Schmidt, G.M. Anderson, J. Zhang, J. Brett, Y.S. Zou, D. Pinsky, D. Stern. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* **269**:9889-9897.
39. Yeh C.H., L. Sturgis, J. Haidacher, X.N. Zhang, S.J. Sherwood, R.J. Bjercke, O. Juhasz, M.T. Crow, R.G. Tilton, L. Denner. 2001. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes.* **50**:1495-1504.
40. Auwerx J.H., S. Deeb, J.D. Brunzell, G. Wolfbauer, A. Chait. 1989. Lipoprotein lipase gene expression in THP-1 cells. *Biochemistry.* **28**:4563-4566.
41. Renier G., A.C. Desfaits, A. Lambert, R. Mikhail. 1996. Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J Lipid Res.* **37**:799-809.
42. Tengku-Muhammad T.S., T.R. Hughes, A. Cryer, D.P. Ramji. 1999. Involvement of both the tyrosine kinase and the phosphatidylinositol-3' kinase signal transduction pathways in the regulation of lipoprotein lipase expression in J774.2 macrophages by cytokines and lipopolysaccharide. *Cytokine.* **11**:463-468.
43. King G.L., H. Ishii, D. Koya. 1997. Diabetic vascular dysfunctions: a model of excessive activation of protein kinase C. *Kidney Int Suppl.* **60**:S77-S85.
44. Kunisaki M., S.E. Bursell, A.C. Clermont, H. Ishii, L.M. Ballas, M.R. Jirousek, F. Umeda, H. Nawata, G.L. King. 1995. Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am J Physiol.* **269**:E239-E246.

45. Taher M.M., J.G. Garcia, V. Natarajan. 1993. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* **303**:260-266.
46. Haneda M., R. Kikkawa, T. Sugimoto, D. Koya, S. Araki, M. Togawa, Y. Shigeta. 1995. Abnormalities in protein kinase C and MAP kinase cascade in mesangial cells cultured under high glucose conditions. *J Diabetes Complications.* **9**:246-248.
47. Dent P., W.D. Jarvis, M.J. Birrer, P.B. Fisher, R.K. Schmidt-Ullrich, S. Grant. 1998. The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to radio- and chemo-sensitization of tumor cells resulting in the induction of apoptosis and loss of clonogenicity. *Leukemia.* **12**:1843-1850.
48. Clerk A., A. Michael, P.H. Sugden. 1998. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J.* **333** ( Pt 3):581-589.
49. Hattori Y., H. Kakishita, K. Akimoto, M. Matsumura, K. Kasai. 2001. Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* **281**:891-896.
50. Nakamura N., H. Obayashi, M. Fujii, M. Fukui, K. Yoshimori, M. Ogata, G. Hasegawa, H. Shigeta, Y. Kitagawa, T. Yoshikawa, M. Kondo, M. Ohta, M. Nishimura, T. Nishinaka, C.Y. Nishimura. 2000. Induction of aldose reductase in

- cultured human microvascular endothelial cells by advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med.* **29**:17-25.
51. Simm A., G. Munch, F. Seif, O. Schenk, A. Heidland, H. Richter, S. Vamvakas, R. Schinzel. 1997. Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *FEBS Lett.* **410**:481-484.
52. Iwashima Y., M. Eto, A. Hata, K. Kaku, S. Horiuchi, F. Ushikubi, H. Sano. 2000. Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **277**:368-380.
53. Li R.C., P. Ping, J. Zhang, W.B. Wead, X. Cao, J. Gao, Y. Zheng, S. Huang, J. Han, R. Bolli. 2000. PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**:H1679-H1689.
54. Soh J.W., E.H. Lee, R. Prywes, I.B. Weinstein. 1999. Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol.* **19**:1313-1324.
55. Hu E., J.B. Kim, P. Sarraf, B.M. Spiegelman. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science.* **274**:2100-2103.
56. Araki N., T. Higashi, T. Mori, R. Shibayama, Y. Kawabe, T. Kodama, K. Takahashi, M. Shichiri, S. Horiuchi. 1995. Macrophage scavenger receptor mediates the

endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem.* **230**:408-415.

57. Ohgami N., R. Nagai, M. Ikemoto, H. Arai, A. Miyazaki, H. Hakamata, S. Horiuchi, H. Nakayama. 2002. CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications.* **16**:56-59.
58. Thornalley P.J. 1998. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand).* **44**:1013-1023.
59. Mead J.R., S.A. Irvine, D.P. Ramji. 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med.* **80**: 753-769.

### **III. Discussion**

### **III.1. Importance de la LPL macrophagique dans le processus athéromateux.**

L'idée que la LPL sécrétée par les macrophages dans la paroi artérielle puisse jouer un rôle pro-athérogénique a d'abord été proposée par Zilversmit dans une étude documentant une corrélation positive entre l'activité de la LPL dans la paroi artérielle et la sévérité des lésions athéromateuses (Corey et Zilversmit, 1977). L'observation que la LPL était sécrétée par les macrophages et les CML dans les lésions athéromateuses (Chait et al., 1982) et que des souris montrant une susceptibilité accrue à l'athérosclérose surexprimaient la LPL macrophagique comparativement à des souris résistantes à la maladie (Renier et al., 1993) a étayé au cours des dix dernières années cette hypothèse.

Ce n'est que très récemment que des études menées sur des animaux ont confirmé le concept du rôle pro-athérogénique de la LPL macrophagique. Dans ces modèles animaux, l'absence de LPL macrophagique était associée à une diminution importante de la surface des lésions athéromateuses (Babaev et al., 1999; Babaev et al., 2000; Van Eck et al., 2000). À l'inverse, une surexpression de la LPL macrophagique chez des souris apoE<sup>-/-</sup> était associée à une augmentation de l'étendue des lésions athéromateuses (Wilson et al., 2001). Pris dans leur ensemble, ces travaux démontrent que la LPL macrophagique contribue de manière importante à l'athérogénèse.

### **III.2. Régulation de la LPL macrophagique dans l'HF**

L'HF est une maladie génétique à transmission autosomique dominante associée à une augmentation de 96 fois des risques de mortalité cardiovasculaire comparativement à la population générale, particulièrement avant l'âge de 45 ans (Hegele, 2002). Bien que le

rôle crucial de la LPL macrophagique dans le développement athéromateux ait été bien documenté ces dernières années, une seule étude à ce jour a étudié l'expression de cette enzyme dans l'HF et a rapporté une élévation de la LPL plasmatique post-héparine chez des patients HF homozygotes (Dugi et al., 1997). Les niveaux de LPL plasmatique corrélaient avec l'étendue des lésions athéromateuses chez ces sujets. Les auteurs de cette étude suggéraient que l'augmentation de la LPL plasmatique post-héparine puisse refléter l'expression massive de LPL macrophagique dans la paroi vasculaire. Dans notre première étude, nous avons évalué l'expression de la LPL par des macrophages dérivés de monocytes isolés de sujets HF. En accord avec l'hypothèse de Dugi, nous avons démontré une augmentation de la LPL macrophagique chez ces sujets. De manière intéressante, nous avons aussi démontré que les macrophages isolés de sujets sains incubés en présence de sérum HF produisaient plus de LPL que ceux incubés dans le sérum autologue. Cette observation a récemment été corroborée par une étude de Holven KB et coll. Ces auteurs ont démontré que des cellules périphériques mononucléaires sanguines (PBMC) isolées de sujets contrôles incubées en présence de sérum HF démontraient une induction de la relâche de chémokines, telles l'IL-8 et la protéine inflammatoire du macrophage (MIP) (Holven et al., 2003).

Afin de vérifier si l'augmentation de la LPL observée dans le milieu de culture des macrophages HF cultivés dans du sérum autologue était d'origine macrophagique ou sérique, nous avons dosé les niveaux de LPL dans le sérum des sujets contrôles et HF. Nos résultats démontrant des niveaux de LPL similaires dans ces sérums confirment l'origine macrophagique de l'augmentation de LPL documentée dans notre étude. Ces données nous

ont amené à postuler que des facteurs présents dans le sérum des patients HF puissent contribuer à l'augmentation de la production de la LPL macrophagique chez ces sujets et être responsables de la surexpression de LPL par les macrophages dérivés de sujets sains mais incubés en présence de sérum HF. Le cholestérol total et le LDL-cholestérol étant deux facteurs sériques augmentés de manière importante dans l'HF, un rôle de ces facteurs dans la surexpression de la LPL macrophagique dans l'HF semblait pouvoir être postulé.

Au vu de la présence d'un élément de réponse aux stérols, le SRE (voir section I.3.2.1) s'étendant de la position -90 à -81 dans le promoteur du gène de la LPL, il est possible que le cholestérol puisse réguler, à un niveau transcriptionnel, l'expression de la LPL. En effet, une étude a démontré qu'une surexpression de SREPB-1 induisait une multitude de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, incluant la LPL adipocytaire (Kim et Spiegelman, 1996). De plus, il a été rapporté que l'addition de cholestérol dans le milieu de culture d'adipocytes isolés causait une diminution des niveaux d'ARNm de la LPL (Schoonjans et al., 2000) et qu'inversement, une déplétion en cholestérol induisait l'expression génique de l'enzyme, via le SRE2 (Schoonjans et al., 2000). Dans le même ordre d'idée, il a été observé qu'une déplétion en cholestérol, par un traitement à la mévastatine, activait le SREBP-2 adipocytaire chez des rats obèses (Le Lay et al., 2001). Il est bien documenté que la LPL adipocytaire et macrophagique sont régulées de façon différentielle et souvent inverse (Preiss-Landl et al., 2002). Bien que les résultats cités s'appliquent à la LPL adipocytaire, il est possible que la LPL macrophagique, comprenant le même site SRE dans son promoteur, soit régulée par un mécanisme similaire.

Nous n'avons toutefois pas observé de corrélation statistiquement significative entre les niveaux de cholestérol total ou de LDL-cholestérol et l'expression de la LPL macrophagique, que ce soit au niveau de la masse ou de l'activité de l'enzyme. Bien que non significative sur le plan statistique, la corrélation entre ces paramètres et la masse de la LPL macrophagique avait cependant une tendance à être positive (cholesterol total et LDL cholesterol :  $R=0.559$ ). Le même type de relation a aussi été observé entre ces paramètres et l'activité de la LPL macrophagique (cholestérol total :  $R=0.463$ , LDL-cholesterol :  $R=0.423$ ). Vu le nombre relativement faible de patients recrutés dans notre étude ( $n=13$ ), ces données n'excluent pas un rôle régulateur du cholestérol, total ou associé aux LDL, sur l'expression de la LPL macrophagique. Des études sur de plus grandes cohortes semblent donc nécessaires pour éclaircir le rôle de ces facteurs dans la régulation de la LPL macrophagique. À ma connaissance, seulement deux études ont vérifié à ce jour l'effet du LDL-cholestérol et du cholestérol libre sur l'expression de la LPL macrophagique in vitro (Hulten et al., 1996; Stengel et al., 1998). Ces études ont démontré une augmentation non significative de l'activité et de l'expression génique de la LPL macrophagique humaine en réponse au LDL-cholestérol natif ou au cholestérol libre (Hulten et al., 1996; Stengel et al., 1998).

L'oxydation des LDL se produit dans la paroi vasculaire et est associée au développement athéromateux. Avec le développement de nouveaux anticorps, la présence de LDL oxydées dans le plasma a pu être détectée (Itabe, 2003) et une augmentation de leurs niveaux plasmatiques a pu être démontrée dans l'HF (Van Tits et al., 2003). Bien que les niveaux plasmatiques de LDL oxydées n'aient pas été mesurés dans notre étude, il est

donc fort probable qu'elles aient été présentes dans le sérum dont nous avons supplémenté le milieu de culture des monocytes isolés des patients HF et qu'elles aient pu ainsi moduler l'expression de la LPL macrophagique. À cet effet, une étude a rapporté que les LDL oxydées diminuaient les niveaux d'ARNm et d'activité de la LPL macrophagique (Stengel et al., 1998). Cet effet était observé en présence de LDL fortement oxydées alors que les LDL oxydées *in vitro* en présence de  $\text{CuCl}_2$  pendant des courtes périodes de temps, soit d'une à quatre heures, n'avaient pas d'effet ou augmentaient même légèrement l'activité de la LPL. Étant donné que des LDL oxydées en présence de cuivre sont peu semblables biologiquement à celles retrouvées *in vivo*, qui elles sont minimalement oxydées par les cellules vasculaires (Itabe, 2003), ces données suggèrent que les LDL minimalement oxydées présentes dans le plasma des sujets HF pourraient participer à l'induction de l'expression de la LPL macrophagique chez ces patients.

Un autre facteur sérique pouvant jouer un rôle dans l'augmentation de la LPL macrophagique documentée dans notre étude est le PDGF-BB. En effet, il a été démontré *in vitro* que ce facteur stimule l'expression génique et la synthèse de la LPL macrophagique (Inaba et al., 1995). En accord avec nos résultats, il a été rapporté que les niveaux sériques de PDGF-BB étaient élevés chez les sujets hypercholestérolémiques (Bath et Martin, 1991). L'hypothèse que ce facteur de croissance puisse jouer un rôle dans la surexpression de la LPL macrophagique dans l'HF est supportée par la corrélation positive que nous avons observée entre les niveaux sériques de PDGF-BB et la masse et l'activité de la LPL produite par les macrophages isolés de sujets HF. Afin de vérifier l'implication directe du PDGF-BB dans l'induction de la LPL macrophagique dans l'HF, nous avons

immunoneutralisé ce facteur dans le sérum des sujets HF. Cette expérience a démontré que l'immunoneutralisation du PDGF-BB ne renversait pas l'induction de la LPL macrophagique chez les sujets HF mais diminuait la production de la LPL par les macrophages contrôles incubés en présence de sérum HF. Ces observations indiquent, tel que démontré par Inaba et coll., que le PDGF-BB stimule l'expression de la LPL macrophagique dans des conditions normales mais qu'il ne contribue pas de manière significative à la surexpression de la LPL macrophagique dans l'HF.

Parmi les autres facteurs sériques augmentés dans l'HF et susceptibles de moduler l'expression de la LPL macrophagique se retrouve l'endothéline-1. Effectivement, il a été documenté que les concentrations sériques d'endothéline-1 étaient accrues dans l'HF (Bath et Martin, 1991) et que l'endothéline était un régulateur de la LPL adipocytaire (Uchida et al., 1995). Puisque nous n'avons pas mesuré la concentration sérique d'endothéline dans notre cohorte, l'importance de ce facteur dans la surexpression de la LPL macrophagique dans l'HF reste à examiner.

Malgré la présence accrue dans le sérum des patients atteints d'HF de divers facteurs susceptibles de réguler la LPL macrophagique, notre observation que les macrophages HF incubés en présence de sérum contrôle produisent une quantité de LPL équivalente à celle observée dans le milieu de macrophages HF incubés en présence de sérum autologue plaident en défaveur d'un rôle des facteurs périphériques dans l'augmentation d'expression de la LPL macrophagique dans l'HF. Ce constat est aussi supporté par nos données rapportant que l'immunoneutralisation du PDGF-BB n'affecte

pas, malgré l'association positive décrite entre ces paramètres, les niveaux de LPL sécrétée par les macrophages HF. Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes puissent être responsables ou contribuent à l'induction de la LPL macrophagique dans l'HF.

Il a été documenté que l'activation du récepteur scavenger induisait la production de LPL macrophagique de 40 à 80% (Murata Y et al, 1988). Bien qu'il n'existe aucune évidence dans la littérature concernant le niveau d'expression des récepteurs scavenger dans l'HF, il est possible que ceux-ci soient activés compte tenu de la présence accrue de LDL oxydées dans l'HF (Van Tits et al., 2003) et qu'ils contribuent, du moins partiellement, à l'augmentation de la sécrétion de la LPL macrophagique dans cette pathologie. Il est aussi possible d'émettre l'hypothèse que les macrophages isolés de sujets HF puissent être différents génétiquement des macrophages de sujets sains (Stein et al., 2002). Cette hypothèse est supportée par une étude réalisée par Renier et coll. démontrant que des souris susceptibles à l'athérosclérose surexpriment la LPL macrophagique comparativement à des souris résistantes à la maladie (Renier et al., 1993). Dans le même ordre d'idée, il a été rapporté que des patients HF présentant une mutation identique du récepteur LDL, démontraient une susceptibilité différente à l'athérosclérose (Stein et al., 2002). Bien que les mécanismes conduisant à de telles observations demeurent inexplicés à ce jour, il est possible que notre cohorte de patients soit différente génétiquement des sujets contrôles et que cette variation génétique soit le fondement de la surexpression de la LPL macrophagique dans l'HF.

Alternativement, il est envisageable que l'induction de la LPL soit le reflet d'un état inflammatoire généralisé des monocytes/macrophages des sujets HF. Une augmentation de la sécrétion de la LPL par les macrophages inflammatoires a été documentée (Behr et Kraemer, 1986b). Cette hypothèse est supportée par l'observation que des PBMC isolées de sujets HF hétérozygotes (Holven et al., 2003) démontrent une sécrétion accrue de MIP-1 $\alpha$  et d'IL-8. Cette notion est aussi appuyée par l'observation que des PBMC isolées de sujets HF homozygotes sécrètent des niveaux élevés de TNF $\alpha$  en réponse à la LPS (Leirisalo-Repo et al., 1990; Rovers et al., 1998). Afin de vérifier cette éventualité, nous avons mesuré les niveaux de base de différentes cytokines, incluant le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 dans les surnageants des macrophages contrôles ou HF incubés en présence de sérum autologue. Nos résultats démontrent que la capacité des macrophages à relâcher spontanément ces cytokines n'est pas altérée dans l'HF à l'exception de l'IL-6, dont la sécrétion est diminuée. En résumé, ces données suggèrent que les macrophages des sujets HF ne sont pas dans un état activé et qu'un état inflammatoire généralisé n'est pas responsable de l'augmentation de la LPL macrophagique.

Somme toute, les résultats de cette première étude démontrent que la LPL macrophagique est surexprimée par les macrophages de sujets HF hétérozygotes et suggèrent que cette enzyme puisse contribuer au développement accéléré de l'athérosclérose associée à cette maladie. Au vu du petit nombre de patients recrutés dans notre étude et de l'hétérogénéité du groupe expérimental, des études cliniques prospectives randomisées incluant de large cohorte, avant et après traitement thérapeutique, sont nécessaires pour préciser la régulation de la LPL macrophagique dans l'HF.

### III.3. Régulation de la LPL macrophagique par l'homocystéine

Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire, ont démontré que des macrophages dérivés de monocytes isolés de sujets diabétiques de type 2 surexprimaient la LPL et que des facteurs sériques étaient en partie responsables de cette augmentation. Le rôle de certains facteurs métaboliques altérés dans le diabète tels le glucose et les acides gras a été mis en évidence par des études subséquentes réalisées *in vitro* (Michaud et Renier, 2001; Sartippour et al., 1998). L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant des MCV. Cette relation est encore plus forte dans le diabète de type 2 et il a été rapporté que le niveau d'hcys était un facteur prédictif de morbidité et de mortalité dans le diabète de type 2. Dans cette seconde étude, nous avons évalué l'effet direct de l'hcys sur l'expression de la LPL macrophagique *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons observé une augmentation des niveaux d'ARNm, de la masse et de l'activité de la LPL macrophagique en présence d'hcys. Le fait que les niveaux d'ARNm et de la masse variaient de manière semblable suggère que l'hcys puisse réguler la LPL macrophagique à un niveau transcriptionnel. Tel que décrit auparavant, le promoteur du gène de la LPL contient une séquence AP-1 lié par l'homodimère c-jun/c-jun ou l'hétérodimère c-fos/c-jun (Enerback et Gimble, 1993). Il a été rapporté que l'hcys augmentait les niveaux d'ARNm du facteur de transcription c-fos dans les CML et les adipocytes (Dalton et al., 1997; Suzuki et al., 2000) et induisait une augmentation de l'activité de AP-1 (Suzuki et al., 2000). Ces observations sont confirmées par nos résultats démontrant une augmentation précoce de l'expression génique de c-fos, en réponse à l'hcys. Le rôle de c-fos dans la régulation transcriptionnelle de la LPL est

supporté par nos résultats indiquant une augmentation de la liaison des protéines nucléaires à la séquence AP-1 du promoteur du gène de la LPL.

Il est maintenant connu que l'interaction de c-fos avec l'élément de réponse AP-1 est régulée par l'activation de la PKC. Comme la PKC est une molécule de signalisation impliquée dans la régulation de la LPL macrophagique (Sartippour et al., 1998) et qu'elle est activée par l'hcys dans les CML (Dalton et al., 1997), il n'est pas surprenant de constater que l'hcys induise l'activation de la PKC dans notre système expérimental. Nos résultats démontrant qu'un inhibiteur de la PKC, la calphostine C, abolit l'induction de la LPL par l'hcys, souligne le rôle crucial de la PKC dans la régulation de la LPL par cet acide aminé.

D'autres molécules de signalisation activées par l'hcys incluent les MAPK. La famille des MAPK comprend les ERK 1/2, la JNK et la p38 MAPK. Diverses études ont documenté une activation de la JNK dans les cellules endothéliales et neuronales par l'hcys (Cai et al., 2000; Robert et al., 2004; Zhang et al., 2001b). L'activation des ERK 1/2 dans les CML et les adipocytes par l'hcys a aussi été documentée (Brown et al., 1998; Suzuki et al., 2000). De manière intéressante, l'implication des ERK 1/2 et de la p38 MAPK dans l'induction du MCP-1 et de l'IL-8 en réponse à l'hcys a été rapportée dans les monocytes humains (Zeng et al., 2003). Les seules études répertoriées dans la littérature ayant vérifié l'implication des MAPK dans la régulation de la LPL concernent la LPL adipocytaire. Une étude de Boney CM et coll. a démontré que l'inhibition des MAPK stimulait l'expression génique de la LPL par les adipocytes 3T3-L1 (Boney et al., 2000) tandis que le groupe de

Cho et coll. a rapporté une diminution parallèle de la phosphorylation des ERK et de l'expression génique de la LPL en réponse à l'acide alpha-lipoïque dans le même type cellulaire (Cho et al., 2003). À l'inverse, aucun effet de l'inhibition des ERK n'a été observé sur les niveaux d'activité de la LPL provenant d'adipocytes 3T3-F442A (Ranganathan et al., 2002). Au vu de ces données, qui n'étaient pas disponibles au moment de nos travaux, il est tentant de spéculer que les ERK puissent jouer un rôle dans la régulation de la LPL macrophagique par l'hcys. Cette possibilité est d'autant plus intéressante lorsque l'on met en parallèle les résultats d'une ancienne étude documentant une activation biphasique des ERK en réponse à un stimulus, atteignant un maximum d'activation à 10 minutes et à 4 heures, (Meloche et al., 1992) et les nôtres montrant une augmentation biphasique similaire de la LPL en réponse à l'hcys, plafonnant à 1 et 6 heures.

Outre la PKC et les MAPK, il a été rapporté que l'hcys induisait la sécrétion de MCP-1 et d'IL-8 par les monocytes humains via la production de ROS produits par la NADPH oxydase (Zeng et al., 2003), une des sources majeures de ROS dans le diabète (Guzik et al., 2002). Il a aussi été démontré que la PKC, cruciale dans la modulation de l'expression de la LPL macrophagique par l'hcys, est sensible aux niveaux de stress oxydatif dans les monocytes/macrophages (Cathcart, 2004). De manière intéressante, il a été documenté que l'expression génique et la production de la LPL macrophagique étaient induites en présence d'intermédiaires réactifs oxygénés (ROI) (Renier et al., 1996). Mises ensemble, ces données suggèrent que les ROS induits par l'hcys dans les macrophages pourraient contribuer à l'augmentation de l'expression génique et protéique de la LPL

observée en réponse à l'hcys. Une façon simple de vérifier cette possibilité aurait été de mesurer la production des ROS et l'expression de la NADPH oxydase dans notre modèle expérimental et de vérifier l'implication de ces deux paramètres dans l'augmentation de la LPL par l'hcys, par l'ajout d'antioxydants ou d'inhibiteurs de la NADPH oxydase.

Outre l'AP-1, d'autres facteurs de transcription activés par l'hcys ont été décrits dans nombre d'études et incluent le NF-kB (Woo et al., 2003) et les PPARs. Comme le promoteur du gène de la LPL ne contient pas de site de liaison au NF-kB, ce facteur de transcription ne peut être impliqué dans la régulation transcriptionnelle de la LPL. Pour leur part, les PPARs sont des facteurs de transcription pouvant se lier au promoteur du gène de la LPL en se liant à un élément de réponse aux PPARs (PPRE) présent dans le promoteur du gène de la LPL (Li et al., 2002b). Les connaissances concernant l'effet de l'hcys sur l'activation des PPARs sont limitées. Récemment, il a été démontré que l'hcys pouvait se lier directement à deux isoformes des PPARs, soit le PPAR $\alpha$  et le PPAR $\gamma$ , et que cet acide aminé pouvait entrer en compétition avec des ligands de ces PPARs, tels que le ciprofibrate et la prostaglandine-J2 (PGJ2) dans les cellules endothéliales (Hunt et Tyagi, 2002). Il a en outre été rapporté que l'hcys inactivait les PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  dans les cellules endothéliales et le PPAR $\gamma$  dans les CML (Mujumdar et al., 2002) et une étude clinique a rapporté une corrélation négative entre les niveaux d'hcys et de PPAR $\beta$  (Brude et al., 1999). Seule une étude a utilisé des monocytes et a rapporté que l'hcys induisait l'expression de MCP-1 et d'IL-8 monocyttaire via l'activation de PPAR $\gamma$  (Zeng et al., 2003). Au vu de ces dernières données, nous avons donc testé la possibilité que l'hcys puisse réguler la LPL via l'activation des PPARs. Nos résultats (non publiés) n'ont pu

démontrer aucune variation de la liaison des protéines nucléaires à la séquence PPRE du promoteur du gène de la LPL, excluant un rôle important des PPARs dans la régulation de la LPL macrophagique par l'hcys.

Une observation importante de notre étude est que l'hcys à une concentration de 1 mM augmentait la masse mais non l'activité de la LPL macrophagique. L'anticorps utilisé pour doser la masse de la LPL dans les surnageants des macrophages reconnaît les formes monomérique et dimérique de l'enzyme. Ces résultats suggèrent que la LPL produite en présence d'1 mM hcys est essentiellement sous sa forme inactive ou monomérique. Même sous cette forme, la LPL joue un rôle physiologiquement pertinent dans le processus athéromateux. En effet, plusieurs études *in vitro* ont rapporté un rôle pro-athérogénique de la LPL macrophagique monomérique, i.e. sous sa forme inactive (Mead et Ramji, 2002). Ces études ont démontré que la LPL inactive agissait comme un pont moléculaire entre les cellules vasculaires et les lipoprotéines, et favorisait ainsi l'accumulation des lipoprotéines dans la paroi vasculaire ainsi que leur captation par les macrophages (Mead, 2002). Appuyant ces études *in vitro*, Merkel et coll. ont montré, dans un modèle de souris transgéniques surexprimant une forme inactive de la LPL humaine, que la LPL, même sans activité catalytique, stimulait *in vivo* la captation tissulaire des lipoprotéines (Merkel et al., 1998; Merkel et al., 2002a; Merkel et al., 2002b).

Une limite importante de notre étude est la concentration supraphysiologique d'hcys située entre 0.1 et 5 mM, nécessaire à induire *in vitro* la LPL macrophagique. En effet, tel que décrit dans la section I.1.7.3, les niveaux sériques maximum d'hcys rencontrés dans

promoteur du gène de la LPL en présence des AGEs. De manière intéressante, l'induction de AP-1 par les AGEs était réduite par les inhibiteurs de la PKC et des ERK 1/2, indiquant que ce processus était dépendant de l'activation de ces deux kinases et survenait en aval de leur activation.

Des études récentes ont démontré que les AGEs induisaient l'activation de la PKC dans les cellules mésangiales et les macrophages (Miyahara et al., 2002; Scivittaro et al., 2000; Wu et al., 2002; Wu et al., 2003). Comme la PKC est clairement impliquée dans la régulation de la LPL macrophagique par le glucose et le PDGF-BB (Inaba et al., 1995; Sartippour et al., 1998), nous avons évalué son rôle dans l'effet inducteur des AGEs. Dans notre modèle expérimental, une activation de la PKC macrophagique en réponse aux AGEs a été observée. De plus, par des expériences incluant différents inhibiteurs de la PKC, nous avons démontré que l'activation de cette kinase était essentielle à la stimulation de la LPL macrophagique par les AGEs. De manière intéressante, nous avons souligné l'importance de l'isoforme PKC $\beta$  dans cet effet par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le LY379196. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures dans lesquelles une activation des isoformes PKC $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\delta$  et  $\theta$  était observée dans des macrophages RAW 264.7 incubés en présence de AGEs (Wu et al., 2003). Dans le même ordre d'idée, il a aussi été démontré que les AGEs induisaient l'activation de la PKC $\beta$ II dans les cellules mésangiales (Scivittaro et al., 2000) et dans les cellules endothéliales bovines rétinienne (Mamputu et Renier, 2004). Prises dans leur ensemble, ces observations appuient la notion de l'importance de l'isoforme PKC $\beta$  dans les complications vasculaires diabétiques (Beckman et al., 2002c; King et al., 1997; Kunisaki et al., 1995).

Le fait que nos expériences utilisant la calphostine C aient été réalisées dans un milieu hyperglycémique en présence de AGEs soulève la question à savoir si l'effet inhibiteur de ce composé sur la LPL était dû à l'abolition de l'activation de la PKC par les AGEs ou par le glucose. Deux arguments appuient l'idée que l'effet de la calphostine C sur l'expression de la LPL était relié à son effet inhibiteur sur l'activation de la PKC par les AGEs. D'abord, nous avons observé que le glucose n'augmentait pas significativement l'expression de la LPL macrophagique à 24 heures et que la calphostine C n'avait pas d'effet sur la LPL dans ces conditions. De plus, nous avons démontré que la calphostine C abolissait l'induction de la LPL par les AGEs.

Nos résultats montrant que des concentrations élevées de glucose étaient nécessaires à l'induction de la LPL macrophagique par les AGEs pourraient être expliqués par la variation dans la cinétique d'activation de la PKC en réponse au glucose ou aux AGEs. Nous avons rapporté que les AGEs induisaient l'activité de la PKC rapidement (30 à 60 minutes), et ce, même en présence de 5.6 mM glucose. Par contre, le glucose nécessitait au moins 24 heures pour induire l'activation de la PKC (résultats non publiés) dans notre système expérimental. À partir de ces résultats, il est tentant de postuler que les AGEs, bien que n'ayant pas d'effet dans un milieu normoglycémique, pourraient accélérer l'activation de la PKC dans un environnement hyperglycémique, requis à l'induction de l'expression de la LPL macrophagique en réponse aux AGEs.

Une multitude d'études ont rapporté l'activation de diverses voies de signalisation en réponse aux AGEs. Parmi celles-ci, l'induction du stress oxydatif par la liaison des

AGEs au RAGE à la surface de divers types de cellules a été documentée. Tel que décrit plus tôt, la LPL macrophagique est sensible au stress oxydatif (Renier et al., 1996). Nos résultats montrant une inhibition de la stimulation de la LPL par les AGEs en présence d'antioxydants démontrent l'implication du stress oxydatif induit par l'interaction des AGEs avec le macrophage dans cet effet biologique.

Il a été rapporté que la PKC était sensible au stress oxydatif dans diverses cellules vasculaires incluant les monocytes/macrophages, les cellules mésangiales et les cellules endothéliales (Cathcart, 2004; Lee et al., 2003; Taher et al., 1993). En accord avec ces résultats, nous avons démontré que l'activation de la PKC dans les macrophages J774 était dépendante du stress oxydatif. Nos observations démontrant l'effet inhibiteur des antioxydants sur l'activation de la PKC par les AGEs suggèrent que l'activation de cette kinase survient consécutivement à l'augmentation du stress oxydatif.

Diverses évidences suggèrent que les MAPK sont activées en aval de la PKC dans les cellules vasculaires (Dent et al., 1998; Hattori et al., 2001). En outre, il a été rapporté que la PKC et les ERK étaient co-activées dans des cellules maintenues dans un milieu hyperglycémique (Haneda et al., 1995). De plus, une étude de Yeh CH et coll. a documenté l'activation et la phosphorylation des ERK par les AGEs dans les cellules monocytaires THP-1 (Yeh et al., 2001). De manière similaire, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation des ERK 1/2 dans nos cellules macrophagiques traitées par les AGEs. L'utilisation d'inhibiteurs de ces kinases dans notre étude démontre clairement que l'activation des ERK 1/2 est requise pour la stimulation de la LPL par les

AGEs. De manière intéressante, l'activation des ERK 1/2 était dépendante de la PKC et du stress oxydatif, tel que démontré par l'inhibition de la phosphorylation des ERK 1/2 par la calphostine C, le LY379196 et l'antioxydant NAC. Bref, nos travaux suggèrent que les AGEs induisent séquentiellement une augmentation des niveaux de stress oxydatif, une activation de la PKC et des ERK 1/2 dans les macrophages, et démontrent le rôle critique de chacun de ces médiateurs dans l'augmentation d'expression de la LPL en réponse à ces facteurs.

Une publication récente a rapporté que la p38 MAPK était activée par les AGEs dans les macrophages murins RAW 264.7 (Wu et al., 2002). Bien qu'à ce jour, il n'existe aucune évidence de la régulation de la LPL par la p38 MAPK, une étude a rapporté qu'une phosphorylation de la p38 MAPK suivie d'une différenciation de cellules souches mésenchymales en adipocytes était associée à une augmentation de l'expression de la LPL (Jaiswal et al., 2000). Il est connu que la p38 MAPK est sensible au stress oxydatif (Torres et Forman, 2003), tout comme la LPL (Renier et al., 1996). Au vu de ces données, il est possible que cette kinase soit aussi impliquée dans l'effet inducteur des AGEs sur la LPL macrophagique.

Plusieurs récepteurs des AGEs ont été identifiés incluant le RAGE, le CD36, le SR-A, le SR-B1 et, plus récemment, le LOX-1 (Jono et al., 2002; Miyazaki et al., 2002). L'importance de ces récepteurs a récemment été soulignée dans une étude utilisant des essais de liaison et montrant une augmentation de la capacité de liaison des AGEs aux PBMC provenant de sujets diabétiques (Festa et al., 1998). Il a aussi été démontré que les

AGEs induisaient l'expression de divers récepteurs scavenger des macrophages dérivés de monocytes humains, incluant le SR-A, le SR-B1, le CD36 et le LOX-1, favorisant la formation des cellules spumeuses (Iwashima et al., 2000). D'autre part, il a été démontré que le glucose induisait l'expression macrophagique du CD36 et que ce dernier était surexprimé dans les lésions athéromateuses provenant de sujets hyperglycémiques (Griffin et al., 2001). Très récemment, il a enfin été rapporté que le glucose stimulait l'expression de LOX-1 dans les macrophages humains (Li L, *circ res*, 2004). Dans le but de déterminer la nature du/des récepteur(s) impliqué(s) dans la régulation de la LPL par les AGEs, nous avons incubé les macrophages murins avec des anticorps spécifiques au RAGE, CD36 et SR-A. Nos résultats ont démontré une diminution des niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique en présence d'un anticorps anti-RAGE. Par contre, aucune modulation n'a été observée en présence des anticorps anti-CD36 et anti-SR-A. La spécificité de cet effet a été vérifiée par l'utilisation d'un anticorps anti-IgG<sub>1</sub> non-spécifique et d'un anticorps anti-Fcγ récepteur. Ce dernier est impliqué dans la réponse inflammatoire des macrophages et son expression est associée à un état général d'activation de la cellule (Loefering et Lennartz, 2004). Nous n'avons trouvé aucune modification des niveaux d'ARNm de la LPL lors de l'incubation des macrophages avec un anticorps spécifique anti-FcγR2, démontrant que l'augmentation de l'expression de la LPL n'était pas due à un état général d'activation des macrophages et que ce récepteur n'était nullement impliqué dans la surexpression de la LPL. Les mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la régulation de la LPL macrophagique en réponse à l'hcys et aux AGEs dans le diabète de type 2 sont illustrés à la figure 1.

l'hyperhomocystéinémie sévère approximativement 100  $\mu\text{M}$ . Bien qu'il soit possible que la concentration d'hcys retrouvé dans l'environnement limité de la plaque athéromateuse puisse être suffisante pour induire l'effet que nous avons observé in vitro, aucune étude à ce jour n'a pu déterminer clairement la concentration d'hcys présente dans les lésions athérosclérotiques. Un autre point majeur est que l'hcys commerciale utilisée dans notre étude comprenait les deux énantiomères de l'hcys, soit la DL-hcys, chacun représentant 50%. Le fait que seule la L-hcys soit active biologiquement nous permet d'affirmer que la concentration réelle d'hcys nécessaire à l'induction de la LPL macrophagique est en fait de moitié moindre que celle rapportée dans notre étude. Une façon de contourner ce problème aurait été de séparer les deux énantiomères de l'hcys en utilisant au départ leurs thiolactones et en mesurant la concentration finale de thiol par spectrophotométrie (Hatch et al., 1961; Poddar et al., 2001). À la lumière de ces résultats, il reste difficile de conclure avec assurance quant à la pertinence biologique de nos observations in vivo.

Pour mieux adresser cette question, il aurait été approprié d'isoler des monocytes de sujets humains, de les différencier en macrophages et de les traiter avec l'hcys. Le désavantage de cette technique est la faible quantité de matériel biologique isolé, limitant l'étude des mécanismes moléculaires ou des voies de signalisation intracellulaires pouvant être impliqués dans l'effet biologique observé, qui était un des principaux intérêts de nos travaux.

Afin de travailler de la façon la plus physiologique possible, nous aurions aussi pu préalablement lier l'hcys à l'albumine. En effet, de 70 à 80% de l'hcys sérique circule sous

une forme liée aux protéines plasmatiques, et surtout à l'albumine. De cette manière, les macrophages auraient été exposés à l'hcys telle qu'elle se présente majoritairement in vivo. Il a été rapporté que des protéines sériques, principalement l'albumine, pouvaient être homocystéinylées en présence d'hcys in vitro (Jakubowski, 1999). Par contre, aucune étude in vitro, à ma connaissance, n'a traité de cellules vasculaires en utilisant l'hcys liée à l'albumine ou à aucune autre protéine, utilisant plutôt l'hcys sous sa forme thiol libre, qui ne représente que 1% de l'hcys total sanguin. De 20 à 30% de l'hcys plasmatique se retrouve aussi sous sa forme liée à elle-même ou à la cystéine. L'homocystine, une forme où l'hcys est liée à elle-même, est maintenant disponible commercialement. Il aurait été intéressant de traiter les macrophages avec cette homocystine afin de comparer son effet biologique à celui de l'hcys. Finalement, il est important de souligner que l'effet de l'hcys observé dans notre étude était spécifique, tel que démontré par l'absence de modulation de l'expression de la LPL macrophagique en présence de L-cystéine.

En résumé, cette deuxième étude démontre que des niveaux élevés d'hcys induisent in vitro l'expression génique et la sécrétion de la LPL macrophagique. Cet effet était médié, du moins en partie, par l'activation de la PKC et du facteur de transcription c-fos. La stimulation de la LPL macrophagique par l'hcys suggère un nouveau mécanisme par lequel cet acide aminé pourrait favoriser le développement accéléré des MCV associées au diabète de type 2.

#### **III.4. Régulation de la LPL macrophagique par les AGEs**

Fondé sur notre étude antérieure démontrant que les sujets diabétiques de type 2 surexprimaient la LPL macrophagique et que des facteurs métaboliques étaient en partie responsable de cet effet, l'objectif de cette dernière partie de notre étude était de vérifier l'effet direct des AGEs sur l'expression de la LPL macrophagique. Les AGEs sont des protéines glyquées s'accumulant de manière accélérée dans le sérum, les tissus et la paroi vasculaire des sujets diabétiques. Plusieurs arguments appuient le concept suggérant un rôle important des AGEs dans le développement athéromateux associé au diabète. D'abord, une corrélation positive a été observée entre les niveaux des AGEs dans les tissus et la sévérité des lésions athéromateuses. De plus, les AGEs sont co-localisés avec le RAGE dans les lésions athérosclérotiques de sujets diabétiques et il a été démontré qu'une injection d'une forme soluble de ce récepteur permet le ralentissement du développement de l'athérosclérose dans le diabète expérimental.

Les AGEs altèrent de manière importante la fonction des monocytes/macrophages. En effet, ces facteurs induisent l'expression du TF, contribuant à l'état d'hypercoagulation associé au diabète (Khechai et al., 1997). Les AGEs stimulent aussi l'expression de différents récepteurs aux LDL oxydées, favorisant la formation de cellules spumeuses (Iwashima et al., 2000). Finalement, ils induisent l'expression de cytokines associées à la réponse inflammatoire telles le MCP-1 (Wang et Liu, 2001), l'IL-6 (Iida et al., 1994), le TNF $\alpha$  (Rashid et al., 2001) et la cyclooxygénase-1 (Shanmugam et al., 2003). De manière intéressante, il a été rapporté que les AGEs agissaient de manière synergistique avec le

glucose pour augmenter la production de TNF $\alpha$  et d'IL-6 monocyttaire (Morohoshi et al., 1995).

En accord avec ces dernières observations, nos résultats démontrent que les AGEs potentialisent l'effet inducteur du glucose sur l'expression de la LPL macrophagique, sans toutefois altérer l'expression de cette enzyme en conditions normoglycémiques. Ces résultats appuient encore davantage le rôle majeur des AGEs dans la régulation de la fonction macrophagique dans le diabète.

En se basant sur nos résultats précédents démontrant que le glucose stimulait l'expression de la LPL macrophagique au niveau transcriptionnel (Sartippour et al., 1998), nous avons examiné la possibilité que la régulation de la LPL macrophagique en réponse aux AGEs puisse s'exercer à ce même niveau. Nos résultats rapportant une augmentation concomitante des niveaux d'ARNm et de la masse de la LPL appuient cette possibilité. Des études récentes portant sur la biologie du macrophage ont documenté l'induction par les AGEs, de deux facteurs de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation de la LPL, soit les PPARs (Iwashima et al., 2000) et l'AP-1 (Miyahara et al., 2002). Ceci suggère un rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans la régulation de la LPL macrophagique en réponse aux AGEs et nous a incité à vérifier leur implication par des essais de liaison à l'ADN. Alors que nous n'avons observé aucune modulation de la liaison des protéines nucléaires à la séquence PPRE, suggérant donc que les PPARs n'étaient pas impliqués dans la stimulation de la LPL par les AGEs (résultats non publiés), nous avons montré une augmentation de la liaison de protéines nucléaires à la séquence AP-1 du

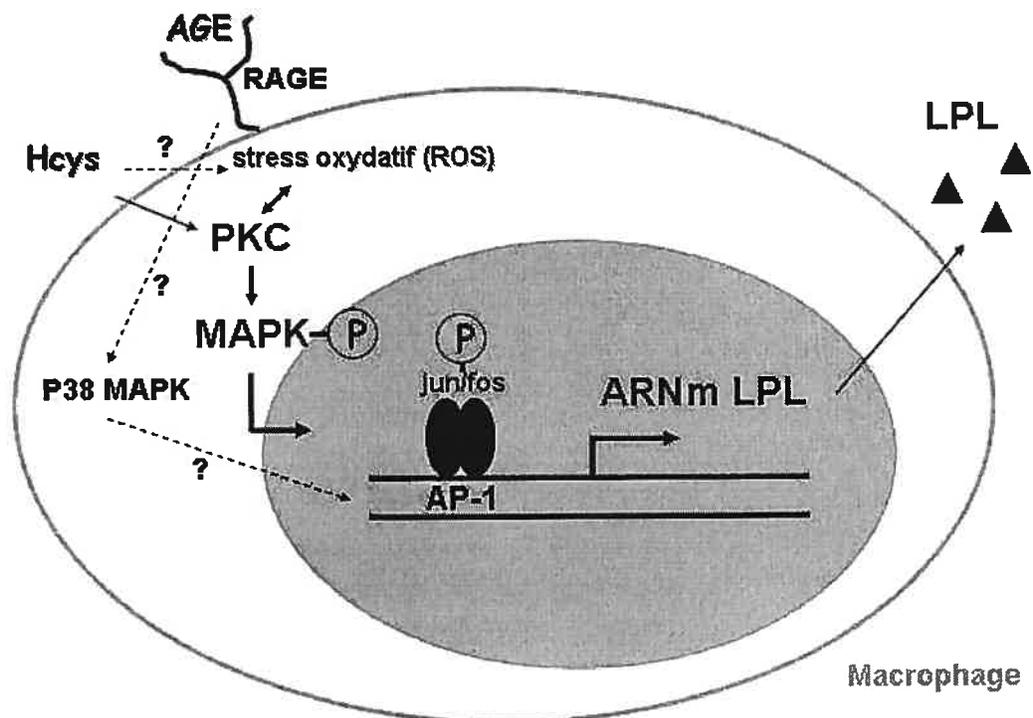


Figure 1. Mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression de la LPL macrophagique par les AGEs et l'hcys.

Une question d'importance majeure est celle relative à la pertinence biologique de nos observations. Le degré de modification des AGEs utilisés dans notre étude dépasse très probablement celui retrouvé *in vivo*. Nous avons partiellement adressé cette question par l'utilisation de AGEs formés en présence d'une faible concentration de glucose (50 mM (GlyAGEs)). Ces AGEs sont plus susceptibles de ressembler à ceux retrouvés *in vivo* et dans l'état diabétique. De manière intéressante, nous avons pu démontrer que les GlyAGEs induisaient une augmentation des niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique similaire à

ceux induits par les AGEs. Toutefois, seules des études utilisant des AGEs isolés de sujets diabétiques permettront de déterminer de manière définitive la pertinence de nos observations in vitro.

En résumé, cette dernière étude démontre que les AGEs potentialisent l'effet stimulant du glucose sur l'expression génique et la sécrétion de la LPL macrophagique. Cette induction était médiée, du moins en partie, par l'induction du stress oxydatif, l'activation de la PKC et des MAPK, et du facteur de transcription AP-1. L'augmentation d'expression de la LPL macrophagique par les AGEs suggère un nouveau mécanisme par lequel ces protéines pourraient favoriser le développement accéléré de l'athérosclérose associée au diabète de type 2.

## IV. Conclusion

Les résultats de nos études démontrent que :

- 1) Les macrophages isolés de patients HF hétérozygotes surexpriment la LPL;
- 2) L'homocystéine exerce un effet inducteur direct sur l'expression macrophagique de LPL;
- 3) Les AGEs potentialisent l'effet stimulant du glucose sur l'expression de la LPL macrophagique.

Prises dans leur ensemble, ces données indiquent que la production de la LPL macrophagique est augmentée dans des états pathophysiologiques associés à une athérosclérose accélérée et à une incidence accrue des MCV, tel l'HF hétérozygote, et identifient de nouveaux facteurs et mécanismes pathogéniques potentiellement responsables de la surexpression de la LPL macrophagique dans le diabète de type 2.

## V. Perspectives

Des données accumulées à ce jour, il apparaît clairement que la LPL exerce un rôle anti-athérogénique en périphérie tandis qu'elle joue un rôle pro-athérogénique au niveau de la paroi vasculaire. La régulation de la LPL est tissu-spécifique. Ce fait est particulièrement bien illustré dans le cas du diabète où une diminution de l'activité de la LPL plasmatique et adipocytaire (Mead et al., 2002) s'associe à une augmentation de la LPL macrophagique (Sartippour et Renier, 2000). L'activité de la LPL musculaire est pour sa part diminuée ou inchangée dans cette condition (Chen et al., 1980; Rauramaa et al., 1980). Cette dualité doit absolument être prise en considération dans l'élaboration de nouvelles avenues thérapeutiques visant à contrecarrer les effets néfastes de la LPL dans la paroi vasculaire.

Une première intervention pourrait consister à stimuler l'activité de la LPL plasmatique, adipocytaire ou musculaire. À ce sujet, un nouvel agent activateur de la LPL a récemment été généré, le NO-1886 (Yin et al., 2004a). Ce composé augmente les niveaux d'ARNm et d'activité de la LPL dans le tissu adipeux, le myocarde et le muscle squelettique, causant dès lors une élévation de la masse et de l'activité de la LPL plasmatique post-héparine. Ce composé a été testé dans plusieurs modèles animaux tels le lapin hyperlipidémique (Tsutsumi et al., 2000), le rat diabétique (Kusunoki et al., 2004) et le cochon miniature diabétique (Yin et al., 2004b; Yin et al., 2004a). Ces études ont démontré que le NO-1886 améliorait le profil lipidique, c'est-à-dire induisait une diminution des triglycérides et une augmentation des HDL sériques. Plus récemment, le

NO-1886 a été administré à des porcs miniatures rendus diabétiques par une diète riche en graisse et en sucrose. Suite à ce traitement, il a été documenté que les animaux présentaient une diminution de la taille des adipocytes, des niveaux sériques de  $\text{TNF}\alpha$ , d'AGL et de glucose, ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Yin et al., 2004a). Ces études supportent solidement le concept du rôle anti-athérogénique de la LPL au niveau périphérique et la désigne comme cible thérapeutique de choix dans le traitement du diabète et des MCV.

Une seconde approche envisageable est la réduction des niveaux de LPL macrophagique. À la lumière des résultats apportés par nos travaux, plusieurs interventions à cette fin peuvent être envisagées, incluant la diminution des niveaux plasmatiques d'hcys et l'inhibition de la formation des AGEs.

Les moyens présentement utilisés pour réduire les niveaux plasmatiques d'hcys sont la supplémentation en acide folique, en vitamine B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>. Dans une récente méta-analyse, il a été rapporté que l'acide folique réduisait les niveaux d'hcys de 25 % et que l'addition de vitamine B<sub>12</sub>, mais non celle de B<sub>6</sub>, accentuait cet effet d'environ 7% (Booth et Wang, 2000). Bien qu'une association indépendante et significative ait été démontrée entre l'hyperhomocystéinémie et les MCV, l'absence d'études cliniques prospectives et randomisées ne permet cependant pas d'établir si une réduction des niveaux sériques d'hcys pourrait prévenir ces MCV. Ces études sont présentement en cours.

Une façon évidente de réduire la formation des AGEs et son effet sur la LPL macrophagique consiste en un contrôle glycémique serré chez les sujets diabétiques.

L'étude UKPKS a à ce sujet bien démontré qu'un bon contrôle glycémique réduisait les complications vasculaires diabétiques. Plusieurs autres composés ont été générés visant à réduire la formation des AGEs dont l'aminoguanidine qui semblait prometteur (Rahbar et Figarola, 2003). Toutefois, son utilisation a du être interrompue en raison de ses effets secondaires importants. Tout comme pour l'hcys, des études cliniques à long terme sont présentement en cours afin de vérifier l'effet de différents composés inhibiteurs des AGEs (Rahbar et Figarola, 2003) sur l'incidence des MCV.

L'inhibition des voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'effet stimulant de l'hcys, du glucose et des AGEs sur la LPL macrophagique constitue une approche complémentaire. Parmi celles-ci l'inhibition de la PKC exagérément activée dans le diabète (King et al., 1997) pourrait être une cible importante. Une limitation potentielle de cette approche est l'existence de plusieurs isoformes de la PKC. En accord avec nos travaux, la PKC $\beta$  semble jouer un rôle particulier dans les vasculopathies diabétiques (Kawakami et al., 2002) et un inhibiteur spécifique de cet isoforme a été généré. À ce jour, il n'existe cependant qu'une seule étude chez l'humain rapportant un effet bénéfique du LY333531 sur la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie (Beckman et al., 2002b).

Finalement, il est évident qu'une stratégie visant un seul facteur, en l'occurrence la LPL macrophagique ne peut être suffisante pour réduire le processus athérogénique. Un mode de vie sain, incluant une bonne alimentation et un exercice physique régulier, reste la

thérapie de première ligne dans la prévention des MCV associées à diverses pathologies, telles l'HF et le diabète.

## VI. Bibliographie

(1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352, 837-853.

(2000). Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation* 102, 21-27.

Acton,S., Rigotti,A., Landschulz,K.T., Xu,S., Hobbs,H.H., and Krieger,M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.

Akbar,D.H. (2003). Effect of metformin and sulfonylurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic syndrome. *Endocrine*. 20, 215-218.

Amos,A.F., McCarty,D.J., and Zimmet,P. (1997). The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet. Med.* 14 *Suppl* 5, S1-85.

Amri,E.Z., Teboul,L., Vannier,C., Grimaldi,P.A., and Ailhaud,G. (1996). Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem. J.* 314 ( Pt 2) , 541-546.

Araki,N., Higashi,T., Mori,T., Shibayama,R., Kawabe,Y., Kodama,T., Takahashi,K., Shichiri,M., and Horiuchi,S. (1995). Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur. J. Biochem.* 230, 408-415.

Austin,M.A. (1999). Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 83, 13F-16F.

Austin,M.A., Hokanson,J.E., and Edwards,K.L. (1998). Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* 81, 7B-12B.

Austin,M.A., McKnight,B., Edwards,K.L., Bradley,C.M., McNeely,M.J., Psaty,B.M., Brunzell,J.D., and Motulsky,A.G. (2000). Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation* 101, 2777-2782.

Aviram,M., Bierman,E.L., and Chait,A. (1988). Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase induces enhanced uptake and cholesterol accumulation in cells. *J. Biol. Chem.* 263, 15416-15422.

Babaev,V.R., Fazio,S., Gleaves,L.A., Carter,K.J., Semenkovich,C.F., and Linton,M.F. (1999). Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J. Clin. Invest* 103, 1697-1705.

Babaev,V.R., Patel,M.B., Semenkovich,C.F., Fazio,S., and Linton,M.F. (2000). Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 275, 26293-26299.

Bailey,A.J., Sims,T.J., Avery,N.C., and Miles,C.A. (1993). Chemistry of collagen cross-links: glucose-mediated covalent cross-linking of type-IV collagen in lens capsules. *Biochem. J.* 296 ( Pt 2), 489-496.

Baron,A.D. (1999). Vascular reactivity. *Am. J. Cardiol.* 84, 25J-27J.

Baron,A.D., Steinberg,H.O., Chaker,H., Leaming,R., Johnson,A., and Brechtel,G. (1995). Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans. *J. Clin. Invest* 96, 786-792.

Bate,K.L. and Jerums,G. (2003). 3: Preventing complications of diabetes. *Med. J. Aust.* 179, 498-503.

Bath,P.M. and Martin,J.F. (1991). Serum platelet-derived growth factor and endothelin concentrations in human hypercholesterolaemia. *J. Intern. Med.* 230, 313-317.

Beckman,J.A., Creager,M.A., and Libby,P. (2002a). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287, 2570-2581.

Beckman,J.A., Goldfine,A.B., Gordon,M.B., Garrett,L.A., and Creager,M.A. (2002c). Inhibition of protein kinase C $\beta$  prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ. Res.* 90, 107-111.

Beckman,J.A., Goldfine,A.B., Gordon,M.B., Garrett,L.A., and Creager,M.A. (2002b). Inhibition of protein kinase C $\beta$  prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ. Res.* 90, 107-111.

Beckman,J.S. (2001). -OONO: rebounding from nitric oxide. *Circ. Res.* 89, 295-297.

Behr,S.R. and Kraemer,F.B. (1986b). Effects of activation on lipoprotein lipase secretion by macrophages. Evidence for autoregulation. *J. Exp. Med.* 164, 1362-1367.

Behr,S.R. and Kraemer,F.B. (1986a). Regulation of the secretion of lipoprotein lipase by mouse macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 889, 346-354.

Behr,S.R. and Kraemer,F.B. (1988). Insulin deficiency decreases lipoprotein lipase secretion by murine macrophages. *Diabetes* 37, 1076-1081.

Beisswenger,P.J., Szwegold,B.S., and Yeo,K.T. (2001). Glycated proteins in diabetes. *Clin. Lab Med.* 21, 53-78, vi.

Bensadoun,A. (1991). Lipoprotein lipase. *Annu. Rev. Nutr.* 11, 217-237.

Berg,A.H., Combs,T.P., Du,X., Brownlee,M., and Scherer,P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 7, 947-953.

Bierhaus,A., Illmer,T., Kasper,M., Luther,T., Quehenberger,P., Tritschler,H., Wahl,P., Ziegler,R., Muller,M., and Nawroth,P.P. (1997). Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96, 2262-2271.

Biswas,T.K. (2003). Endothelium, atherosclerosis and calcium channel blockers. *J. Indian Med. Assoc.* 101, 428-431.

Boger,R.H., Bode-Boger,S.M., Sydow,K., Heistad,D.D., and Lentz,S.R. (2000). Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1557-1564.

Boney,C.M., Gruppuso,P.A., Faris,R.A., and Frackelton,A.R., Jr. (2000). The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol. Endocrinol.* 14, 805-813.

Booth,G.L. and Wang,E.E. (2000). Preventive health care, 2000 update: screening and management of hyperhomocysteinemia for the prevention of coronary artery disease events. The Canadian Task Force on Preventive Health Care. *CMAJ.* 163, 21-29.

Brendle,D.C., Joseph,L.J., Corretti,M.C., Gardner,A.W., and Katzel,L.I. (2001). Effects of exercise rehabilitation on endothelial reactivity in older patients with peripheral arterial disease. *Am. J. Cardiol.* 87, 324-329.

Brown,J.C., Rosenquist,T.H., and Monaghan,D.T. (1998). ERK2 activation by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 669-676.

Brude,I.R., Finstad,H.S., Seljeflot,I., Drevon,C.A., Solvoll,K., Sandstad,B., Hjermann,I., Arnesen,H., and Nenseter,M.S. (1999). Plasma homocysteine concentration related to diet, endothelial function and mononuclear cell gene expression among male hyperlipidaemic smokers. *Eur. J. Clin. Invest* 29, 100-108.

Bruun,J.M., Pedersen,S.B., and Richelsen,B. (2000). Interleukin-8 production in human adipose tissue. inhibitory effects of anti-diabetic compounds, the thiazolidinedione ciglitazone and the biguanide metformin. *Horm. Metab Res.* 32, 537-541.

Bucala,R., Makita,Z., Vega,G., Grundy,S., Koschinsky,T., Cerami,A., and Vlassara,H. (1994). Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 9441-9445.

Bucala,R., Mitchell,R., Arnold,K., Innerarity,T., Vlassara,H., and Cerami,A. (1995). Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 10828-10832.

Bullo,M., Garcia-Lorda,P., Peinado-Onsurbe,J., Hernandez,M., Del Castillo,D., Argiles,J.M., and Salas-Salvado,J. (2002). TNFalpha expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 26, 652-658.

Burns,D.M. (2003). Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 46, 11-29.

Cai,Y., Zhang,C., Nawa,T., Aso,T., Tanaka,M., Oshiro,S., Ichijo,H., and Kitajima,S. (2000). Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and promoter response element. *Blood* 96, 2140-2148.

Calles-Escandon,J. and Cipolla,M. (2001). Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr. Rev.* 22, 36-52.

Cannon,R.O., III (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.* 44, 1809-1819.

Cathcart,M.K. (2004). Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 23-28.

Cermak,J., Key,N.S., Bach,R.R., Balla,J., Jacob,H.S., and Vercellotti,G.M. (1993). C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* 82, 513-520.

Chait,A., Iverius,P.H., and Brunzell,J.D. (1982). Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J. Clin. Invest* 69, 490-493.

Chao,C.L., Kuo,T.L., and Lee,Y.T. (2000). Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation* 101, 485-490.

Chen,Y.D., Howard,J., Huang,V., Kraemer,F.B., and Reaven,G.M. (1980). Dissociation between plasma triglyceride concentration and tissue lipoprotein lipase deficiency in insulin-deficient rats. *Diabetes* 29 , 643-647.

Cho,K.J., Moon,H.E., Moini,H., Packer,L., Yoon,D.Y., and Chung,A.S. (2003). Alpha-lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors via mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 34823-34833.

Clarke,R., Daly,L., Robinson,K., Naughten,E., Cahalane,S., Fowler,B., and Graham,I. (1991). Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1149-1155.

Clarkson,P., Montgomery,H.E., Mullen,M.J., Donald,A.E., Powe,A.J., Bull,T., Jubb,M., World,M., and Deanfield,J.E. (1999). Exercise training enhances endothelial function in young men. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 1379-1385.

Clee,S.M., Bissada,N., Miao,F., Miao,L., Marais,A.D., Henderson,H.E., Steures,P., McManus,J., McManus,B., LeBoeuf,R.C., Kastelein,J.J., and Hayden,M.R. (2000). Plasma

and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* *41*, 521-531.

Cockerill,G.W., Huehns,T.Y., Weerasinghe,A., Stocker,C., Lerch,P.G., Miller,N.E., and Haskard,D.O. (2001). Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* *103*, 108-112.

Coleman,L.T. (1997). Systematic approach to the management of the Type II diabetic patient: case presentation. *Pharm. Pract. Manag. Q.* *17*, 65-75.

Coombes,B.K. and Mahony,J.B. (1999). Chlamydia pneumoniae infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via an endothelial cell-derived soluble factor(s). *Infect. Immun.* *67*, 2909-2915.

Coppack,S.W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* *60*, 349-356.

Corey,J.E. and Zilvermit,D.B. (1977). Effect of cholesterol feeding on arterial lipolytic activity in the rabbit. *Atherosclerosis* *27*, 201-212.

Dalton,M.L., Gadson,P.F., Jr., Wrenn,R.W., and Rosenquist,T.H. (1997). Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myb in smooth muscle cells. *FASEB J.* *11*, 703-711.

Danesh,J., Collins,R., Appleby,P., and Peto,R. (1998). Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* *279*, 1477-1482.

Danesh,J., Collins,R., and Peto,R. (2000a). Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* *102*, 1082-1085.

Danesh,J., Collins,R., Peto,R., and Lowe,G.D. (2000b). Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *Eur. Heart J.* *21*, 515-520.

Danesh,J., Whincup,P., Walker,M., Lennon,L., Thomson,A., Appleby,P., Wong,Y., Bernardes-Silva,M., and Ward,M. (2000c). Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ* *321*, 208-213.

Das,U.N. (2002). Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp. Biol. Med.* (Maywood. ) *227*, 989-997.

Das,U.N. (2003). Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition* *19*, 686-692.

Davda,R.K., Stepniakowski,K.T., Lu,G., Ullian,M.E., Goodfriend,T.L., and Egan,B.M. (1995). Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension* 26, 764-770.

De Pergola,G. (2000). The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 24 *Suppl* 2, S59-S63.

Demuth,K., Atger,V., Borderie,D., Benoit,M.O., Sauvaget,D., Lotersztajn,S., and Moatti,N. (1999). Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 263, 367-376.

Dent,P., Jarvis,W.D., Birrer,M.J., Fisher,P.B., Schmidt-Ullrich,R.K., and Grant,S. (1998). The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to r. *Leukemia* 12, 1843-1850.

Devaraj,S., Xu,D.Y., and Jialal,I. (2003). C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 107, 398-404.

Dobrian,A.D., Lazar,V., Sinescu,C., Mincu,D., and Simionescu,M. (2000). Diabetic state induces lipid loading and altered expression and secretion of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Atherosclerosis* 153, 191-201.

Domin,W.S., Chait,A., and Deeb,S.S. (1991). Transcriptional activation of the lipoprotein lipase gene in macrophages by dexamethasone. *Biochemistry* 30, 2570-2574.

Dong,Q. and Wright,J.R. (1996). Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J. Immunol.* 156, 4815-4820.

Dovgan,P.S., Edwards,J.D., Zhan,X., Wilde,M., and Agrawal,D.K. (1994). Cigarette smoking increases monocyte adherence to cultured endothelial cell monolayer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 929-934.

Dugi,K.A., Feuerstein,I.M., Hill,S., Shih,J., Santamarina-Fojo,S., Brewer,H.B., Jr., and Hoeg,J.M. (1997). Lipoprotein lipase correlates positively and hepatic lipase inversely with calcific atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 354-364.

Durand,P., Lussier-Cacan,S., and Blache,D. (1997). Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J.* 11, 1157-1168.

Durrington,P. (2003). Dyslipidaemia. *Lancet* 362, 717-731.

Dyer,D.G., Blackledge,J.A., Katz,B.M., Hull,C.J., Adkisson,H.D., Thorpe,S.R., Lyons,T.J., and Baynes,J.W. (1991). The Maillard reaction in vivo. *Z. Ernährungswiss.* 30, 29-45.

Eberhardt,R.T., Forgione,M.A., Cap,A., Leopold,J.A., Rudd,M.A., Trolliet,M., Heydrick,S., Stark,R., Klings,E.S., Moldovan,N.I., Yaghoubi,M., Goldschmidt-Clermont,P.J., Farber,H.W., Cohen,R., and Loscalzo,J. (2000). Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest* 106, 483-491.

Eckel,R.H. (1989). Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* 320, 1060-1068.

Eckel,R.H. and Krauss,R.M. (1998). American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. *Circulation* 97, 2099-2100.

Enerback,S. and Gimble,J.M. (1993). Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 107-125.

Ernst,E. and Resch,K.L. (1995). Therapeutic interventions to lower plasma fibrinogen concentration. *Eur. Heart J.* 16 *Suppl A* , 47-52.

Evans,A.J., Sawyez,C.G., Wolfe,B.M., Connelly,P.W., Maguire,G.F., and Huff,M.W. (1993). Evidence that cholesteryl ester and triglyceride accumulation in J774 macrophages induced by very low density lipoprotein subfractions occurs by different mechanisms. *J. Lipid Res.* 34, 703-717.

Fan,J. and Watanabe,T. (2003). Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* *10*, 63-71.

Febbraio,M., Hajjar,D.P., and Silverstein,R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest* *108*, 785-791.

Ferrannini,E., Barrett,E.J., Bevilacqua,S., Jacob,R., Walesky,M., Sherwin,R.S., and DeFronzo,R.A. (1986). Effect of free fatty acids on blood amino acid levels in human. *Am. J. Physiol* *250*, E686-E694.

Festa,A., D'Agostino,R., Jr., Howard,G., Mykkanen,L., Tracy,R.P., and Haffner,S.M. (2000). Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* *102*, 42-47.

Festa,A., Hanley,A.J., Tracy,R.P., D'Agostino,R., Jr., and Haffner,S.M. (2003). Inflammation in the prediabetic state is related to increased insulin resistance rather than decreased insulin secretion. *Circulation* *108*, 1822-1830.

Festa,A., Schmolzer,B., Schernthaner,G., and Menzel,E.J. (1998). Differential expression of receptors for advanced glycation end products on monocytes in patients with IDDM. *Diabetologia* *41*, 674-680.

Fichtlscherer,S., Rosenberger,G., Walter,D.H., Breuer,S., Dimmeler,S., and Zeiher,A.M. (2000). Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102, 1000-1006.

Fichtlscherer,S. and Zeiher,A.M. (2000). Endothelial dysfunction in acute coronary syndromes: association with elevated C-reactive protein levels. *Ann. Med.* 32, 515-518.

Finegood,D.T. (2003). Obesity, inflammation and type II diabetes. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 27 *Suppl* 3, S4-S5.

Fonseca,V., Guba,S.C., and Fink,L.M. (1999). Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr. Rev.* 20, 738-759.

Frick,M.H., Elo,O., Haapa,K., Heinonen,O.P., Heinsalmi,P., Helo,P., Huttunen,J.K., Kaitaniemi,P., Koskinen,P., Manninen,V., and . (1987). 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.

Fried,S.K., Russell,C.D., Grauso,N.L., and Brodin,R.E. (1993). Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J. Clin. Invest* 92, 2191-2198.

Frishman,W.H. and Ismail,A.A. (2002). Role of infection in atherosclerosis and coronary artery disease: a new therapeutic target? *Cardiol. Rev.* *10*, 199-210.

Frohlich,M., Imhof,A., Berg,G., Hutchinson,W.L., Pepys,M.B., Boeing,H., Muche,R., Brenner,H., and Koenig,W. (2000). Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* *23*, 1835-1839.

Fu,M.X., Wells-Knecht,K.J., Blackledge,J.A., Lyons,T.J., Thorpe,S.R., and Baynes,J.W. (1994). Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* *43*, 676-683.

Galve-de Rochemonteix,B., Wiktorowicz,K., Kushner,I., and Dayer,J.M. (1993). C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *53*, 439-445.

Garg,R., Tripathy,D., and Dandona,P. (2003). Insulin resistance as a proinflammatory state: mechanisms, mediators, and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets.* *4*, 487-492.

Gaydos,C.A. (2000). Growth in vascular cells and cytokine production by *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* *181 Suppl 3*, S473-S478.

Girard,J. (2003). [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med. Sci. (Paris)* *19*, 827-833.

Glagov,S., Zarins,C., Giddens,D.P., and Ku,D.N. (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch. Pathol. Lab Med.* *112*, 1018-1031.

Goldenberg,I., Jonas,M., Tenenbaum,A., Boyko,V., Matetzky,S., Shotan,A., Behar,S., and Reicher-Reiss,H. (2003). Current smoking, smoking cessation, and the risk of sudden cardiac death in patients with coronary artery disease. *Arch. Intern. Med.* *163*, 2301-2305.

Gonzalez,M.A. and Selwyn,A.P. (2003). Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am. J. Med.* *115 Suppl 8A*, 99S-106S.

Grainger,D.J., Kirschenlohr,H.L., Metcalfe,J.C., Weissberg,P.L., Wade,D.P., and Lawn,R.M. (1993). Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science* *260*, 1655-1658.

Greenberg,A.S. (2003). The expanding scope of the metabolic syndrome and implications for the management of cardiovascular risk in type 2 diabetes with particular focus on the emerging role of the thiazolidinediones. *J. Diabetes Complications* *17*, 218-228.

Griffin,E., Re,A., Hamel,N., Fu,C., Bush,H., McCaffrey,T., and Asch,A.S. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat. Med.* *7*, 840-846.

Gu,K., Cowie,C.C., and Harris,M.I. (1998). Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 21, 1138-1145.

Guzik,T.J., Mussa,S., Gastaldi,D., Sadowski,J., Ratnatunga,C., Pillai,R., and Channon,K.M. (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105, 1656-1662.

Hackam,D.G. and Anand,S.S. (2003). Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA* 290, 932-940.

Haffner,S.M. (2003). Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am. J. Cardiol.* 92, 18J-26J.

Haffner,S.M., Greenberg,A.S., Weston,W.M., Chen,H., Williams,K., and Freed,M.I. (2002). Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106, 679-684.

Hak,A.E., Stehouwer,C.D., Bots,M.L., Polderman,K.H., Schalkwijk,C.G., Westendorp,I.C., Hofman,A., and Witteman,J.C. (1999). Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1986-1991.

Halcox,J.P., Schenke,W.H., Zalos,G., Mincemoyer,R., Prasad,A., Waclawiw,M.A., Nour,K.R., and Quyyumi,A.A. (2002). Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 106, 653-658.

Haluzik,M., Parizkova,J., and Haluzik,M.M. (2004). Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol Res.* 53, 123-129.

Hammes,H.P., Wellensiek,B., Kloting,I., Sickel,E., Bretzel,R.G., and Brownlee,M. (1998). The relationship of glycaemic level to advanced glycation end-product (AGE) accumulation and retinal pathology in the spontaneous diabetic hamster. *Diabetologia* 41, 165-170.

Haneda,M., Kikkawa,R., Sugimoto,T., Koya,D., Araki,S., Togawa,M., and Shigeta,Y. (1995). Abnormalities in protein kinase C and MAP kinase cascade in mesangial cells cultured under high glucose conditions. *J. Diabetes Complications* 9, 246-248.

Hankey,G.J. and Eikelboom,J.W. (1999). Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 354, 407-413.

Hansen,B.C. (1999). The metabolic syndrome X. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892, 1-24.

Hansson,G.K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1876-1890.

Hansson,L., Zanchetti,A., Carruthers,S.G., Dahlof,B., Elmfeldt,D., Julius,S., Menard,J., Rahn,K.H., Wedel,H., and Westerling,S. (1998). Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet* 351, 1755-1762.

Harjai,K.J. (1999). Potential new cardiovascular risk factors: left ventricular hypertrophy, homocysteine, lipoprotein(a), triglycerides, oxidative stress, and fibrinogen. *Ann. Intern. Med.* 131, 376-386.

Harris,M.I. (1996). Medical care for patients with diabetes. Epidemiologic aspects. *Ann. Intern. Med.* 124, 117-122.

Harris,M.I. (1999). Racial and ethnic differences in health insurance coverage for adults with diabetes. *Diabetes Care* 22, 1679-1682.

HATCH,F.T., LARRABEE,A.R., CATHOU,R.E., and BUCHANAN,J.M. (1961). Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. I. Identification of the enzymes and cofactors involved in the system isolated from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 236, 1095-1101.

Hattori,Y., Kakishita,H., Akimoto,K., Matsumura,M., and Kasai,K. (2001). Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the

mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 891-896.

Hattori, Y., Matsumura, M., and Kasai, K. (2003). Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc. Res.* 58, 186-195.

Hattori, Y., Suzuki, M., Hattori, S., and Kasai, K. (2002). Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts). *Hypertension* 39, 22-28.

Hedrick, C.C., Thorpe, S.R., Fu, M.X., Harper, C.M., Yoo, J., Kim, S.M., Wong, H., and Peters, A.L. (2000). Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 43, 312-320.

Hegele, R.A. (2002). Environmental modulation of atherosclerosis end points in familial hypercholesterolemia. *Atheroscler. Suppl* 2, 5-7.

Henry, R.R. (2003). Insulin resistance: from predisposing factor to therapeutic target in type 2 diabetes. *Clin. Ther.* 25 *Suppl B*, B47-B63.

Hill, J.O. and Peters, J.C. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280, 1371-1374.

Hitsumoto,T., Ohsawa,H., Uchi,T., Noike,H., Kanai,M., Yoshinuma,M., Miyashita,Y., Watanabe,H., and Shirai,K. (2000). Preheparin serum lipoprotein lipase mass is negatively related to coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 153, 391-396.

Holven,K.B., Myhre,A.M., Aukrust,P., Hagve,T.A., Ose,L., and Nenseter,M.S. (2003). Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. Dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender. *Eur. Heart J.* 24, 1756-1762.

Homma,H., Kurachi,H., Nishio,Y., Takeda,T., Yamamoto,T., Adachi,K., Morishige,K., Ohmichi,M., Matsuzawa,Y., and Murata,Y. (2000). Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J. Biol. Chem.* 275, 11404-11411.

Hotamisligil,G.S., Budavari,A., Murray,D., and Spiegelman,B.M. (1994a). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Invest* 94, 1543-1549.

Hotamisligil,G.S., Murray,D.L., Choy,L.N., and Spiegelman,B.M. (1994b). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4854-4858.

Hotamisligil,G.S. and Spiegelman,B.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43, 1271-1278.

Hotta,K., Funahashi,T., Arita,Y., Takahashi,M., Matsuda,M., Okamoto,Y., Iwahashi,H., Kuriyama,H., Ouchi,N., Maeda,K., Nishida,M., Kihara,S., Sakai,N., Nakajima,T., Hasegawa,K., Muraguchi,M., Ohmoto,Y., Nakamura,T., Yamashita,S., Hanafusa,T., and Matsuzawa,Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1595-1599.

Howard,B.V. (1996). Risk factors for cardiovascular disease in individuals with diabetes. The Strong Heart Study. *Acta Diabetol.* 33, 180-184.

Hsueh,W.A. and Quinones,M.J. (2003). Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am. J. Cardiol.* 92, 10J-17J.

Hube,F. and Hauner,H. (1999). The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm. Metab Res.* 31, 626-631.

Hultberg,B., Andersson,A., and Isaksson,A. (1997). The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology* 123, 33-40.

Hulten,L.M., Lindmark,H., Diczfalusy,U., Bjorkhem,I., Ottosson,M., Liu,Y., Bondjers,G., and Wiklund,O. (1996). Oxysterols present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages. *J. Clin. Invest* 97, 461-468.

Hunt,M.J. and Tyagi,S.C. (2002). Peroxisome proliferators compete and ameliorate Hcy-mediated endocardial endothelial cell activation. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283, C1073-C1079.

Iida,Y., Miyata,T., Inagi,R., Sugiyama,S., and Maeda,K. (1994). Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products induces interleukin-6 from human macrophages: role in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1235-1241.

Inaba,T., Kawamura,M., Gotoda,T., Harada,K., Shimada,M., Ohsuga,J., Shimano,H., Akanuma,Y., Yazaki,Y., and Yamada,N. (1995). Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 522-528.

Inadera,H., Tashiro,J., Okubo,Y., Ishikawa,Y., Shirai,K., Saito,Y., and Yoshida,S. (1992). Response of lipoprotein lipase to calorie intake in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand. J. Clin. Lab Invest* 52, 797-802.

Itabe,H. (2003). Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1-9.

Iverius,P.H. and Brunzell,J.D. (1988). Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid level in obese women. *J. Clin. Invest* 82, 1106-1112.

Iwashima,Y., Eto,M., Hata,A., Kaku,K., Horiuchi,S., Ushikubi,F., and Sano,H. (2000). Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 368-380.

Jabs,W.J., Logering,B.A., Gerke,P., Kreft,B., Wolber,E.M., Klinger,M.H., Fricke,L., and Steinhoff,J. (2003). The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur. J. Immunol.* 33, 152-161.

Jaiswal,R.K., Jaiswal,N., Bruder,S.P., Mbalaviele,G., Marshak,D.R., and Pittenger,M.F. (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 9645-9652.

Jakubowski,H. (1999). Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.* 13, 2277-2283.

Jensen,D.R., Schlaepfer,I.R., Morin,C.L., Pennington,D.S., Marcell,T., Ammon,S.M., Gutierrez-Hartmann,A., and Eckel,R.H. (1997). Prevention of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing skeletal muscle lipoprotein lipase. *Am. J. Physiol* 273, R683-R689.

Jono,T., Miyazaki,A., Nagai,R., Sawamura,T., Kitamura,T., and Horiuchi,S. (2002). Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett.* 511, 170-174.

Kalayoglu,M.V., Libby,P., and Byrne,G.I. (2002). Chlamydia pneumoniae as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA* 288, 2724-2731.

Kalayoglu,M.V., Perkins,B.N., and Byrne,G.I. (2001). Chlamydia pneumoniae-infected monocytes exhibit increased adherence to human aortic endothelial cells. *Microbes. Infect.* 3, 963-969.

Kanemaki,T., Kitade,H., Kaibori,M., Sakitani,K., Hiramatsu,Y., Kamiyama,Y., Ito,S., and Okumura,T. (1998). Interleukin 1beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology* 27, 1296-1303.

Kastelein,J.J., Jukema,J.W., Zwinderman,A.H., Clee,S., van Boven,A.J., Jansen,H., Rabelink,T.J., Peters,R.J., Lie,K.I., Liu,G., Bruschke,A.V., and Hayden,M.R. (2000).

Lipoprotein lipase activity is associated with severity of angina pectoris. REGRESS Study Group. *Circulation* 102, 1629-1633.

Katsuki,A., Sumida,Y., Murata,K., Furuta,M., Araki-Sasaki,R., Tsuchihashi,K., Hori,Y., Yano,Y., Gabazza,E.C., and Adachi,Y. (2000). Troglitazone reduces plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab* 2, 189-191.

Kawakami,M., Murase,T., Ishibashi,S., Mori,N., and Takaku,F. (1986). Lipoprotein lipase in mouse peritoneal macrophages: the effects of insulin and dexamethasone. *J. Biochem. (Tokyo)* 100, 1373-1378.

Kawakami,T., Kawakami,Y., and Kitaura,J. (2002). Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 677-682.

Kern,P.A. (1997). Potential role of TNFalpha and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J. Nutr.* 127, 1917S-1922S.

Kern,P.A., Mandic,A., and Eckel,R.H. (1987). Regulation of lipoprotein lipase by glucose in primary cultures of isolated human adipocytes. Relevance to hypertriglyceridemia of diabetes. *Diabetes* 36, 1238-1245.

Kern,P.A., Ong,J.M., Goers,J.W., and Pedersen,M.E. (1988). Regulation of lipoprotein lipase immunoreactive mass in isolated human adipocytes. *J. Clin. Invest* 81, 398-406.

Kern,P.A., Ranganathan,S., Li,C., Wood,L., and Ranganathan,G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 280, E745-E751.

Kern,P.A., Saghizadeh,M., Ong,J.M., Bosch,R.J., Deem,R., and Simsolo,R.B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest* 95, 2111-2119.

Kesaniemi,Y.A. and Grundy,S.M. (1984). Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in man. *JAMA* 251, 2241-2246.

Khalfallah,Y., Sassolas,G., Borson-Chazot,F., Vega,N., and Vidal,H. (2001). Expression of insulin target genes in skeletal muscle and adipose tissue in adult patients with growth hormone deficiency: effect of one year recombinant human growth hormone therapy. *J. Endocrinol.* 171, 285-292.

Khechai,F., Ollivier,V., Bridey,F., Amar,M., Hakim,J., and de Prost,D. (1997). Effect of advanced glycation end product-modified albumin on tissue factor expression by monocytes. Role of oxidant stress and protein tyrosine kinase activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2885-2890.

Kim,J.B. and Spiegelman,B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* *10*, 1096-1107.

Kim,J.K., Fillmore,J.J., Chen,Y., Yu,C., Moore,I.K., Pypaert,M., Lutz,E.P., Kako,Y., Velez-Carrasco,W., Goldberg,I.J., Breslow,J.L., and Shulman,G.I. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 7522-7527.

King,G.L. (1996). The role of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in causing vascular dysfunction in diabetes. *Ann. Med.* *28*, 427-432.

King,G.L., Ishii,H., and Koya,D. (1997). Diabetic vascular dysfunctions: a model of excessive activation of protein kinase C. *Kidney Int. Suppl* *60*, S77-S85.

Kirstein,M., Aston,C., Hintz,R., and Vlassara,H. (1992a). Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J. Clin. Invest* *90*, 439-446.

Kirstein,M., Aston,C., Hintz,R., and Vlassara,H. (1992b). Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J. Clin. Invest* *90*, 439-446.

Kislinger,T., Fu,C., Huber,B., Qu,W., Taguchi,A., Du,Y.S., Hofmann,M., Yan,S.F., Pischetsrieder,M., Stern,D., and Schmidt,A.M. (1999). N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 31740-31749.

Klein,B.E., Klein,R., and Moss,S.E. (1995). Incidence of cataract surgery in the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 119, 295-300.

Knowler,W.C., Barrett-Connor,E., Fowler,S.E., Hamman,R.F., Lachin,J.M., Walker,E.A., and Nathan,D.M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 346, 393-403.

Kol,A., Sukhova,G.K., Lichtman,A.H., and Libby,P. (1998). Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 98, 300-307.

Kotchen,T.A., Reddy,S., and Zhang,H.Y. (1997). Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose-fed rat. *Am. J. Hypertens.* 10, 1020-1026.

Kunisaki,M., Bursell,S.E., Clermont,A.C., Ishii,H., Ballas,L.M., Jirousek,M.R., Umeda,F., Nawata,H., and King,G.L. (1995). Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal

blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am. J. Physiol* 269, E239-E246.

Kunt,T., Forst,T., Wilhelm,A., Tritschler,H., Pfuetzner,A., Harzer,O., Engelbach,M., Zschaebitz,A., Stofft,E., and Beyer,J. (1999). Alpha-lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with advanced glycation end products. *Clin. Sci. (Lond)* 96, 75-82.

Kusunoki,M., Tsutsumi,K., Inoue,Y., Hara,T., Miyata,T., Nakamura,T., Ogawa,H., Sakakibara,F., Fukuzawa,Y., Okabayashi,N., Kato,K., Ikeda,H., Kurokawa,T., Ishikawa,T., Otake,K., and Nakaya,Y. (2004). Lipoprotein lipase activator NO-1886 improves fatty liver caused by high-fat feeding in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 53, 260-263.

Lambert,E.V., Wooding,G., Lambert,M.I., Koeslag,J.H., and Noakes,T.D. (1994). Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. *J. Appl. Physiol* 77, 2564-2571.

Lane,J.T. (2004). Microalbuminuria as a marker of cardiovascular and renal risk in type 2 diabetes mellitus: a temporal perspective. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 286, F442-F450.

Lapsys,N.M., Kriketos,A.D., Lim-Fraser,M., Poynten,A.M., Lowy,A., Furler,S.M., Chisholm,D.J., and Cooney,G.J. (2000). Expression of genes involved in lipid metabolism

correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85, 4293-4297.

Laville,M., Auboeuf,D., Khalfallah,Y., Vega,N., Riou,J.P., and Vidal,H. (1996). Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut 4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle. *J. Clin. Invest* 98, 43-49.

Law,M.R., Wald,N.J., and Thompson,S.G. (1994). By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 308, 367-372.

Le Lay,S., Krief,S., Farnier,C., Lefrere,I., Le,L., X, Bazin,R., Ferre,P., and Dugail,I. (2001). Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 16904-16910.

Lee,H.B., Yu,M.R., Yang,Y., Jiang,Z., and Ha,H. (2003). Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, S241-S245.

Lehr,H.A. (2000). Microcirculatory dysfunction induced by cigarette smoking. *Microcirculation.* 7, 367-384.

Leirisalo-Repo,M., Jaattela,M., Gylling,H., Miettinen,T.A., and Repo,H. (1990). Phagocyte function in familial hypercholesterolaemia: peripheral blood monocytes exposed to

lipopolysaccharide show increased tumour necrosis factor production. *Scand. J. Immunol.* 32, 679-685.

Leone,A. (2003). Relationship between cigarette smoking and other coronary risk factors in atherosclerosis: risk of cardiovascular disease and preventive measures. *Curr. Pharm. Des* 9, 2417-2423.

Li,H., Lewis,A., Brodsky,S., Rieger,R., Iden,C., and Goligorsky,M.S. (2002a). Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis? *Circulation* 105, 1037-1043.

Li,L., Beauchamp,M.C., and Renier,G. (2002b). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists upregulate human macrophage lipoprotein lipase expression. *Atherosclerosis* 165, 101-110.

Li,Y.M., Tan,A.X., and Vlassara,H. (1995). Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. *Nat. Med.* 1, 1057-1061.

Libby,P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91, 2844-2850.

Lillioja,S., Mott,D.M., Spraul,M., Ferraro,R., Foley,J.E., Ravussin,E., Knowler,W.C., Bennett,P.H., and Bogardus,C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329, 1988-1992.

Lindqvist,P., Ostlund-Lindqvist,A.M., Witztum,J.L., Steinberg,D., and Little,J.A. (1983). The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J. Biol. Chem.* 258, 9086-9092.

Loefering,D.J. and Lennartz,M.R. (2004). Signaling pathways for Fc gamma receptor-stimulated tumor necrosis factor-alpha secretion and respiratory burst in RAW 264.7 macrophages. *Inflammation* 28, 23-31.

Loscalzo,J., Weinfeld,M., Fless,G.M., and Scanu,A.M. (1990). Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 10, 240-245.

Lubec,B., Labudova,O., Hoeger,H., Muehl,A., Fang-Kircher,S., Marx,M., Mosgoeller,W., and Gialamas,J. (1996). Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue. *Circulation* 94, 2620-2625.

Luo,J., Rizkalla,S.W., Vidal,H., Oppert,J.M., Colas,C., Boussairi,A., Guerre-Millo,M., Chapuis,A.S., Chevalier,A., Durand,G., and Slama,G. (1998). Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate

the lipid profile in type 2 diabetic men. Results of a controlled study. *Diabetes Care* 21, 717-724.

Lupattelli,G., Marchesi,S., Roscini,A.R., Siepi,D., Gemelli,F., Pirro,M., Sinzinger,H., Schillaci,G., and Mannarino,E. (2002). Direct association between high-density lipoprotein cholesterol and endothelial function in hyperlipemia. *Am. J. Cardiol.* 90, 648-650.

Luscher,T.F., Creager,M.A., Beckman,J.A., and Cosentino,F. (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation* 108, 1655-1661.

Lyon,C.J., Law,R.E., and Hsueh,W.A. (2003). Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 144, 2195-2200.

Machinal-Quelin,F., Dieudonne,M.N., Leneuve,M.C., Pecquery,R., and Giudicelli,Y. (2002). Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282, C853-C863.

MacMahon,S. and Sharpe,N. (1990). Future directions for randomized trials of cardiovascular disease prevention in hypertensive patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 *Suppl* 7, S96-S99.

Maeda,N., Takahashi,M., Funahashi,T., Kihara,S., Nishizawa,H., Kishida,K., Nagaretani,H., Matsuda,M., Komuro,R., Ouchi,N., Kuriyama,H., Hotta,K., Nakamura,T., Shimomura,I., and Matsuzawa,Y. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50, 2094-2099.

Maingrette,F. and Renier,G. (2003). Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes* 52, 2121-2128.

Mamputu,J.C., Desfaits,A.C., and Renier,G. (1997). Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J. Lipid Res.* 38, 1722-1729.

Mamputu,J.C., Levesque,L., and Renier,G. (2000). Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2212-2219.

Mamputu,J.C. and Renier,G. (2004). Signalling pathways involved in retinal endothelial cell proliferation induced by advanced glycation end products: inhibitory effect of gliclazide. *Diabetes Obes. Metab* 6, 95-103.

Manson,J.E., Willett,W.C., Stampfer,M.J., Colditz,G.A., Hunter,D.J., Hankinson,S.E., Hennekens,C.H., and Speizer,F.E. (1995). Body weight and mortality among women. *N. Engl. J. Med.* 333, 677-685.

Mantha,L., Russell,J.C., Brindley,D.N., and Deshaies,Y. (2002). Developmental changes in adipose and muscle lipoprotein lipase activity in the atherosclerosis-prone JCR:LA-corpulent rat. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 26, 308-317.

Maresca,G., Di Blasio,A., Marchioli,R., and Di Minno,G. (1999). Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1368-1377.

Marin,P. (1995). Testosterone and regional fat distribution. *Obes. Res.* 3 *Suppl* 4, 609S-612S.

Marks,D., Thorogood,M., Neil,H.A., and Humphries,S.E. (2003). A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 168, 1-14.

Matsuoka,T., Kajimoto,Y., Watada,H., Kaneto,H., Kishimoto,M., Umayahara,Y., Fujitani,Y., Kamada,T., Kawamori,R., and Yamasaki,Y. (1997). Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J. Clin. Invest* 99, 144-150.

McCarty,M.F. (2001). Modulation of adipocyte lipoprotein lipase expression as a strategy for preventing or treating visceral obesity. *Med. Hypotheses* 57, 192-200.

McTernan,P.G., Harte,A.L., Anderson,L.A., Green,A., Smith,S.A., Holder,J.C., Barnett,A.H., Eggo,M.C., and Kumar,S. (2002b). Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes* 51, 1493-1498.

McTernan,P.G., Harte,A.L., Anderson,L.A., Green,A., Smith,S.A., Holder,J.C., Barnett,A.H., Eggo,M.C., and Kumar,S. (2002a). Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes* 51, 1493-1498.

Mead,J.R., Cryer,A., and Ramji,D.P. (1999b). Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett.* 462, 1-6.

Mead,J.R., Cryer,A., and Ramji,D.P. (1999a). Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett.* 462, 1-6.

Mead,J.R., Irvine,S.A., and Ramji,D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* 80, 753-769.

Mead,J.R. and Ramji,D.P. (2002). The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 55, 261-269.

Meloche,S., Seuwen,K., Pages,G., and Pouyssegur,J. (1992). Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol. Endocrinol.* 6, 845-854.

Mendall,M.A., Goggin,P.M., Molineaux,N., Levy,J., Toosy,T., Strachan,D., Camm,A.J., and Northfield,T.C. (1994). Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *Br. Heart J.* 71, 437-439.

Merkel,M., Eckel,R.H., and Goldberg,I.J. (2002a). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006.

Merkel,M., Heeren,J., Dudeck,W., Rinninger,F., Radner,H., Breslow,J.L., Goldberg,I.J., Zechner,R., and Greten,H. (2002b). Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* 277, 7405-7411.

Merkel,M., Kako,Y., Radner,H., Cho,I.S., Ramasamy,R., Brunzell,J.D., Goldberg,I.J., and Breslow,J.L. (1998). Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13841-13846.

Mertens,A., Verhamme,P., Bielicki,J.K., Phillips,M.C., Quarck,R., Verreth,W., Stengel,D., Ninio,E., Navab,M., Mackness,B., Mackness,M., and Holvoet,P. (2003). Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation* 107, 1640-1646.

Michaud,S.E. and Renier,G. (2001). Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes* 50, 660-666.

Midorikawa,S., Sanada,H., Hashimoto,S., and Watanabe,T. (2000). Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 182-185.

Miller,S.A., Selzman,C.H., Shames,B.D., Barton,H.A., Johnson,S.M., and Harken,A.H. (2000). *Chlamydia pneumoniae* activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J. Surg. Res.* 90, 76-81.

Miyahara,Y., Ikeda,S., Muroya,T., Yasuoka,C., Urata,Y., Horiuchi,S., Kohno,S., and Kondo,T. (2002). Nepsilon-(Carboxymethyl)lysine induces gamma-glutamylcysteine synthetase in RAW264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 32-40.

Miyazaki,A., Nakayama,H., and Horiuchi,S. (2002). Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 258-262.

Moat,S.J., Bonham,J.R., Cragg,R.A., and Powers,H.J. (2000). Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. *Free Radic. Res.* 32, 171-179.

Morohoshi,M., Fujisawa,K., Uchimura,I., and Numano,F. (1995). The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748, 562-570.

Mujumdar,V.S., Tummalapalli,C.M., Aru,G.M., and Tyagi,S.C. (2002). Mechanism of constrictive vascular remodeling by homocysteine: role of PPAR. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282, C1009-C1015.

Murphy,M.C., Zampelas,A., Puddicombe,S.M., Furlonger,N.P., Morgan,L.M., and Williams,C.M. (1993). Pretranslational regulation of the expression of the lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) gene by dietary fatty acids in the rat. *Br. J. Nutr.* 70, 727-736.

Murray,L.J., Bamford,K.B., O'Reilly,D.P., McCrum,E.E., and Evans,A.E. (1995). *Helicobacter pylori* infection: relation with cardiovascular risk factors, ischaemic heart disease, and social class. *Br. Heart J.* 74, 497-501.

Myant,N.B. (1993). Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 104, 1-18.

Nagase,M., Ando,K., Nagase,T., Kaname,S., Sawamura,T., and Fujita,T. (2001). Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 720-725.

Nakata,A., Nakagawa,Y., Nishida,M., Nozaki,S., Miyagawa,J., Nakagawa,T., Tamura,R., Matsumoto,K., Kameda-Takemura,K., Yamashita,S., and Matsuzawa,Y. (1999). CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *19*, 1333-1339.

Nam,S.Y. and Marcus,C. (2000). Growth hormone and adipocyte function in obesity. *Horm. Res.* *53 Suppl 1*, 87-97.

Napolitano,M., Blotta,I., Montali,A., and Bravo,E. (2001). 17beta-estradiol enhances the flux of cholesterol through the cholesteryl ester cycle in human macrophages. *Biosci. Rep.* *21*, 637-652.

Nappo,F., De Rosa,N., Marfella,R., De Lucia,D., Ingrosso,D., Perna,A.F., Farzati,B., and Giugliano,D. (1999). Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* *281*, 2113-2118.

Naruszewicz,M., Selinger,E., Dufour,R., and Davignon,J. (1992). Probucol protects lipoprotein (a) against oxidative modification. *Metabolism* *41*, 1225-1228.

Neeper,M., Schmidt,A.M., Brett,J., Yan,S.D., Wang,F., Pan,Y.C., Elliston,K., Stern,D., and Shaw,A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* *267*, 14998-15004.

Niemela,S., Karttunen,T., Korhonen,T., Laara,E., Karttunen,R., Ikaheimo,M., and Kesaniemi,Y.A. (1996). Could *Helicobacter pylori* infection increase the risk of coronary heart disease by modifying serum lipid concentrations? *Heart* 75, 573-575.

Nishikawa,T., Edelstein,D., Du,X.L., Yamagishi,S., Matsumura,T., Kaneda,Y., Yorek,M.A., Beebe,D., Oates,P.J., Hammes,H.P., Giardino,I., and Brownlee,M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.

Nishimoto,S., Tawara,J., Toyoda,H., Kitamura,K., and Komurasaki,T. (2003). A novel homocysteine-responsive gene, *smap8*, modulates mitogenesis in rat vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.* 270, 2521-2531.

Nygard,O., Vollset,S.E., Refsum,H., Brattstrom,L., and Ueland,P.M. (1999). Total homocysteine and cardiovascular disease. *J. Intern. Med.* 246, 425-454.

Obunike,J.C., Paka,S., Pillarisetti,S., and Goldberg,I.J. (1997). Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1414-1420.

Ohgami,N., Nagai,R., Ikemoto,M., Arai,H., Kuniyasu,A., Horiuchi,S., and Nakayama,H. (2001a). Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276, 3195-3202.

Ohgami,N., Nagai,R., Miyazaki,A., Ikemoto,M., Arai,H., Horiuchi,S., and Nakayama,H. (2001b). Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276, 13348-13355.

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., and Matsuzawa,Y. (2002). Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106, 2767-2770.

Olivecrona,T., Bergh,M., Hultin,M., and Olivecrona,G. (1995). Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can. J. Cardiol.* 11 Suppl G, 73G-78G.

Ong,J.M. and Kern,P.A. (1989). Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J. Clin. Invest* 84, 305-311.

Ong,J.M., Kirchgessner,T.G., Schotz,M.C., and Kern,P.A. (1988a). Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 12933-12938.

Ong,J.M., Kirchgessner,T.G., Schotz,M.C., and Kern,P.A. (1988b). Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 12933-12938.

Oscarsson,J., Ottosson,M., Vikman-Adolfsson,K., Frick,F., Enerback,S., Lithell,H., and Eden,S. (1999). GH but not IGF-I,or insulin increases lipoprotein lipase activity in muscle tissues of hypophysectomised rats. *J. Endocrinol.* *160*, 247-255.

Ouchi,N., Kihara,S., Funahashi,T., Matsuzawa,Y., and Walsh,K. (2003b). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol.* *14*, 561-566.

Ouchi,N., Kihara,S., Funahashi,T., Nakamura,T., Nishida,M., Kumada,M., Okamoto,Y., Ohashi,K., Nagaretani,H., Kishida,K., Nishizawa,H., Maeda,N., Kobayashi,H., Hiraoka,H., and Matsuzawa,Y. (2003a). Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* *107*, 671-674.

Park,L., Raman,K.G., Lee,K.J., Lu,Y., Ferran,L.J., Jr., Chow,W.S., Stern,D., and Schmidt,A.M. (1998). Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat. Med.* *4*, 1025-1031.

Pasceri,V., Cheng,J.S., Willerson,J.T., Yeh,E.T., and Chang,J. (2001). Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* *103*, 2531-2534.

Pasceri,V., Willerson,J.T., and Yeh,E.T. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* *102*, 2165-2168.

Peiris,A.N., Sothmann,M.S., Hoffmann,R.G., Hennes,M.I., Wilson,C.R., Gustafson,A.B., and Kissebah,A.H. (1989). Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Ann. Intern. Med.* 110, 867-872.

Perseghin,G., Petersen,K., and Shulman,G.I. (2003). Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 27 *Suppl* 3, S6-11.

Pfeifer,M.A., Brunzell,J.D., Best,J.D., Judzewitsch,R.G., Halter,J.B., and Porte,D., Jr. (1983). The response of plasma triglyceride, cholesterol, and lipoprotein lipase to treatment in non-insulin-dependent diabetic subjects without familial hypertriglyceridemia. *Diabetes* 32, 525-531.

Picard,F., Richard,D., Huang,Q., and Deshaies,Y. (1998). Effects of leptin adipose tissue lipoprotein lipase in the obese ob/ob mouse. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 22, 1088-1095.

Pickup,J.C. and Crook,M.A. (1998). Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41, 1241-1248.

Pinkney,J.H., Stehouwer,C.D., Coppack,S.W., and Yudkin,J.S. (1997). Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 46 *Suppl* 2, S9-13.

Poddar,R., Sivasubramanian,N., DiBello,P.M., Robinson,K., and Jacobsen,D.W. (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 103, 2717-2723.

Poon,M., Zhang,X., Dunsky,K.G., Taubman,M.B., and Harpel,P.C. (1997). Apolipoprotein(a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelial cells. *Circulation* 96, 2514-2519.

Pradhan,A.D., Manson,J.E., Rifai,N., Buring,J.E., and Ridker,P.M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286, 327-334.

Preiss-Landl,K., Zimmermann,R., Hammerle,G., and Zechner,R. (2002). Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 471-481.

Price,S.R., Olivecrona,T., and Pekala,P.H. (1986). Regulation of lipoprotein lipase synthesis by recombinant tumor necrosis factor--the primary regulatory role of the hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 738-746.

Quehenberger,P., Bierhaus,A., Fasching,P., Muellner,C., Klevesath,M., Hong,M., Stier,G., Sattler,M., Schleicher,E., Speiser,W., and Nawroth,P.P. (2000). Endothelin 1 transcription

is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 49, 1561-1570.

Querfeld,U., Ong,J.M., Prehn,J., Carty,J., Saffari,B., Jordan,S.C., and Kern,P.A. (1990). Effects of cytokines on the production of lipoprotein lipase in cultured human macrophages. *J. Lipid Res.* 31, 1379-1386.

Rahbar,S. and Figarola,J.L. (2003). Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 63-79.

Rakugi,H., Yu,H., Kamitani,A., Nakamura,Y., Ohishi,M., Kamide,K., Nakata,Y., Takami,S., Higaki,J., and Ogihara,T. (1996). Links between hypertension and myocardial infarction. *Am. Heart J.* 132, 213-221.

RANDLE,P.J., GARLAND,P.B., HALES,C.N., and NEWSHOLME,E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.

Ranganathan,G., Li,C., and Kern,P.A. (2000). The translational regulation of lipoprotein lipase in diabetic rats involves the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *J. Biol. Chem.* 275, 40986-40991.

Ranganathan,G., Song,W., Dean,N., Monia,B., Barger,S.W., and Kern,P.A. (2002). Regulation of lipoprotein lipase by protein kinase C alpha in 3T3-F442A adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 38669-38675.

Ranganathan,S., Ciaraldi,T.P., Henry,R.R., Mudaliar,S., and Kern,P.A. (1998). Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology* 139, 2509-2513.

Rashid,G., Luzon,A.A., Korzets,Z., Klein,O., Zeltzer,E., and Bernheim,J. (2001). The effect of advanced glycation end-products and aminoguanidine on TNFalpha production by rat peritoneal macrophages. *Perit. Dial. Int.* 21, 122-129.

Rath,M., Niendorf,A., Reblin,T., Dietel,M., Krebber,H.J., and Beisiegel,U. (1989). Detection and quantification of lipoprotein(a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis* 9, 579-592.

Rattazzi,M., Puato,M., Faggin,E., Bertipaglia,B., Zambon,A., and Pauletto,P. (2003). C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J. Hypertens.* 21, 1787-1803.

Rauramaa,R., Kuusela,P., and Hietanen,E. (1980). Adipose, muscle and lung tissue lipoprotein lipase activities in young streptozotocin treated rats. *Horm. Metab Res.* 12, 591-595.

Rebuffe-Scrive,M., Marin,P., and Bjorntorp,P. (1991). Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men. *Int. J. Obes.* *15*, 791-795.

Renier,G., Oliver,M., Skamene,E., and Radzioch,D. (1994). Induction of tumor necrosis factor alpha gene expression by lipoprotein lipase requires protein kinase C activation. *J. Lipid Res.* *35*, 1413-1421.

Renier,G., Desfaits,A.C., Lambert,A., and Mikhail,R. (1996). Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J. Lipid Res.* *37*, 799-809.

Renier,G., Desfaits,A.C., and Serri,O. (2000). Gliclazide decreases low-density lipoprotein oxidation and monocyte adhesion to the endothelium. *Metabolism* *49*, 17-22.

Renier,G., Skamene,E., DeSanctis,J.B., and Radzioch,D. (1993). High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* *13*, 190-196.

Reynolds,G.D. and Vance,R.P. (1987). C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch. Pathol. Lab Med.* *111*, 265-269.

Richardson,P.D., Davies,M.J., and Born,G.V. (1989). Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 2, 941-944.

Ridker,P.M., Cushman,M., Stampfer,M.J., Tracy,R.P., and Hennekens,C.H. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.* 336, 973-979.

Ridker,P.M., Danesh,J., Youngman,L., Collins,R., Stampfer,M.J., Peto,R., and Hennekens,C.H. (2001). A prospective study of *Helicobacter pylori* seropositivity and the risk for future myocardial infarction among socioeconomically similar U.S. men. *Ann. Intern. Med.* 135, 184-188.

Ridker,P.M., Hennekens,C.H., and Stampfer,M.J. (1993). A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 270, 2195-2199.

Ridker,P.M., Rifai,N., Rose,L., Buring,J.E., and Cook,N.R. (2002). Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 347, 1557-1565.

Ridker,P.M., Stampfer,M.J., and Hennekens,C.H. (1995). Plasma concentration of lipoprotein(a) and the risk of future stroke. *JAMA* 273, 1269-1273.

Riis,H.P., Kharazmi,A., Jauhiainen,M., and Ehnholm,C. (1994). Induction of oxygen free radical generation in human monocytes by lipoprotein(a). *Eur. J. Clin. Invest* 24, 497-499.

Robert,K., Santiard-Baron,D., Chasse,J.F., Paly,E., Aupetit,J., Kamoun,P., London,J., and Janel,N. (2004). The neuronal SAPK/JNK pathway is altered in a murine model of hyperhomocysteinemia. *J. Neurochem.* 89, 33-43.

Roberts,C.K., Barnard,R.J., Liang,K.H., and Vaziri,N.D. (2002). Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 161 , 133-141.

Robinson,K., Arheart,K., Refsum,H., Brattstrom,L., Boers,G., Ueland,P., Rubba,P., Palma-Reis,R., Meleady,R., Daly,L., Witteman,J., and Graham,I. (1998). Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 97, 437-443.

Rodrigueza,W.V., Thuahnai,S.T., Temel,R.E., Lund-Katz,S., Phillips,M.C., and Williams,D.L. (1999). Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 274, 20344-20350.

Ross,R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

Rota,S., McWilliam,N.A., Baglin,T.P., and Byrne,C.D. (1998). Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin E. *Blood* 91, 508-515.

Rovers,C., Netea,M.G., de Bont,N., Demacker,P.N., Jacobs,C., Kullberg,B.J., Van der Meer,J.W., and Stalenhoef,A.F. (1998). LPS-induced cytokine production and expression of beta2-integrins and CD14 by peripheral blood mononuclear cells of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 141, 99-105.

Sambola,A., Osende,J., Hathcock,J., Degen,M., Nemerson,Y., Fuster,V., Crandall,J., and Badimon,J.J. (2003). Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 107, 973-977.

Sammalkorpi,K., Valtonen,V., Kerttula,Y., Nikkila,E., and Taskinen,M.R. (1988). Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism* 37, 859-865.

Sartippour,M.R., Lambert,A., Laframboise,M., St Jacques,P., and Renier,G. (1998). Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47, 431-438.

Sartippour,M.R. and Renier,G. (2000). Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: role of peripheral factors. *Diabetes* 49, 597-602.

Scarsella,C. and Despres,J.P. (2003). [Treatment of obesity: the need to target attention on high-risk patients characterized by abdominal obesity]. *Cad. Saude Publica 19 Suppl 1*, S7-19.

Schachinger,V., Britten,M.B., and Zeiher,A.M. (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation 101*, 1899-1906.

Schalkwijk,C.G., Poland,D.C., van Dijk,W., Kok,A., Emeis,J.J., Drager,A.M., Doni,A., van Hinsbergh,V.W., and Stehouwer,C.D. (1999). Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. *Diabetologia 42*, 351-357.

Schoonjans,K., Gelman,L., Haby,C., Briggs,M., and Auwerx,J. (2000). Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *J. Mol. Biol. 304*, 323-334.

Schoonjans,K., Peinado-Onsurbe,J., Fruchart,J.C., Tailleux,A., Fievet,C., and Auwerx,J. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase. *FEBS Lett. 452*, 160-164.

Schoonjans,K., Peinado-Onsurbe,J., Lefebvre,A.M., Heyman,R.A., Briggs,M., Deeb,S., Staels,B., and Auwerx,J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336-5348.

Scivittaro,V., Ganz,M.B., and Weiss,M.F. (2000). AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278, F676-F683.

Semenkovich,C.F., Coleman,T., and Daugherty,A. (1998). Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J. Lipid Res.* 39, 1141-1151.

Semenkovich,C.F., Wims,M., Noe,L., Etienne,J., and Chan,L. (1989). Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J. Biol. Chem.* 264, 9030-9038.

Serri,O., Li,L., Maingrette,F., Jaffry,N., and Renier,G. (2004). Enhanced lipoprotein lipase secretion and foam cell formation by macrophages of patients with growth hormone deficiency: possible contribution to increased risk of atherogenesis? *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 979-985.

Shah,P.K. (2003). Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 15S-22S.

Shanmugam,N., Kim,Y.S., Lanting,L., and Natarajan,R. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 278, 34834-34844.

Shimada,M., Ishibashi,S., Yamamoto,K., Kawamura,M., Watanabe,Y., Gotoda,T., Harada,K., Inaba,T., Ohsuga,J., Yazaki,Y., and . (1995). Overexpression of human lipoprotein lipase increases hormone-sensitive lipase activity in adipose tissue of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 761-766.

Simsolo,R.B., Ong,J.M., and Kern,P.A. (1993). The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. *J. Clin. Invest* 92, 2124-2130.

Simsolo,R.B., Ong,J.M., Saffari,B., and Kern,P.A. (1992). Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J. Lipid Res.* 33, 89-95.

Singh,R., Barden,A., Mori,T., and Beilin,L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.

Slack,J. (1969). Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states. *Lancet* 2, 1380-1382.

Sowers,J.R. (2003). Recommendations for special populations: diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am. J. Hypertens.* 16, 41S-45S.

Srikanthan,V.S. and Dunn,F.G. (1997). Hypertension and coronary artery disease. *Med. Clin. North Am.* 81, 1147-1163.

Stamler,J., Stamler,R., and Neaton,J.D. (1993a). Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch. Intern. Med.* 153, 598-615.

Stamler,J., Vaccaro,O., Neaton,J.D., and Wentworth,D. (1993b). Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16, 434-444.

Starkebaum,G. and Harlan,J.M. (1986). Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest* 77, 1370-1376.

Stary,H.C., Chandler,A.B., Dinsmore,R.E., Fuster,V., Glagov,S., Insull,W., Jr., Rosenfeld,M.E., Schwartz,C.J., Wagner,W.D., and Wissler,R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis.

A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355-1374.

Stefan,N., Bunt,J.C., Salbe,A.D., Funahashi,T., Matsuzawa,Y., and Tataranni,P.A. (2002). Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 4652-4656.

Stein,O., Thiery,J., and Stein,Y. (2002). Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 160, 1-10.

Steinberg,H.O., Chaker,H., Leaming,R., Johnson,A., Brechtel,G., and Baron,A.D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest* 97, 2601-2610.

Stengel,D., Antonucci,M., Gaoua,W., Dachet,C., Lesnik,P., Hourton,D., Ninio,E., Chapman,M.J., and Griglio,S. (1998). Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state: a key role for lysophosphatidylcholine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1172-1180.

Stith,R.D. and Luo,J. (1994). Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ. Shock* 44, 210-215.

Stitt,A.W., He,C., Friedman,S., Scher,L., Rossi,P., Ong,L., Founds,H., Li,Y.M., Bucala,R., and Vlassara,H. (1997). Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Mol. Med.* 3, 617-627.

Strachan,D.P., Mendall,M.A., Carrington,D., Butland,B.K., Yarnell,J.W., Sweetnam,P.M., and Elwood,P.C. (1998). Relation of *Helicobacter pylori* infection to 13-year mortality and incident ischemic heart disease in the caerphilly prospective heart disease study. *Circulation* 98, 1286-1290.

Sun,M., Yokoyama,M., Ishiwata,T., and Asano,G. (1998). Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int. J. Exp. Pathol.* 79, 207-222.

Suwaidi,J.A., Hamasaki,S., Higano,S.T., Nishimura,R.A., Holmes,D.R., Jr., and Lerman,A. (2000). Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101, 948-954.

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., and . (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292-296.

Suzuki,Y.J., Lorenzi,M.V., Shi,S.S., Day,R.M., and Blumberg,J.B. (2000). Homocysteine exerts cell type-specific inhibition of AP-1 transcription factor. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 39-45.

Taher,M.M., Garcia,J.G., and Natarajan,V. (1993). Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 260-266.

Takahashi,S. and Satozawa,N. (2002). The 20-kD Human Growth Hormone Reduces Body Fat by Increasing Lipolysis and Decreasing Lipoprotein Lipase Activity. *Horm. Res.* 58, 157-164.

Taskinen,M.R. (1987). Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 3, 551-570.

Tavangar,K., Murata,Y., Pedersen,M.E., Goers,J.F., Hoffman,A.R., and Kraemer,F.B. (1992). Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J. Clin. Invest* 90, 1672-1678.

Tengku-Muhammad,T.S., Cryer,A., and Ramji,D.P. (1998). Synergism between interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in the regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line. *Cytokine* 10, 38-48.

Tengku-Muhammad,T.S., Hughes,T.R., Cryer,A., and Ramji,D.P. (1996). Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines. *Cytokine* 8, 525-533.

Tengku-Muhammad,T.S., Hughes,T.R., Cryer,A., and Ramji,D.P. (1999). Involvement of both the tyrosine kinase and the phosphatidylinositol-3' kinase signal transduction pathways in the regulation of lipoprotein lipase expression in J774.2 macrophages by cytokines and lipopolysaccharide. *Cytokine* 11, 463-468.

Torres,M. and Forman,H.J. (2003). Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17, 287-296.

Torzewski,M., Rist,C., Mortensen,R.F., Zwaka,T.P., Bienek,M., Waltenberger,J., Koenig,W., Schmitz,G., Hombach,V., and Torzewski,J. (2000). C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2094-2099.

Tracy,R.P., Lemaitre,R.N., Psaty,B.M., Ives,D.G., Evans,R.W., Cushman,M., Meilahn,E.N., and Kuller,L.H. (1997). Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1121-1127.

- Tsai,J.C., Perrella,M.A., Yoshizumi,M., Hsieh,C.M., Haber,E., Schlegel,R., and Lee,M.E. (1994). Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 6369-6373.
- Tsai,J.C., Wang,H., Perrella,M.A., Yoshizumi,M., Sibinga,N.E., Tan,L.C., Haber,E., Chang,T.H., Schlegel,R., and Lee,M.E. (1996). Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* 97, 146-153.
- Tsutsumi,K., Inoue,Y., and Murase,T. (2000). Effects of NO-1886, a lipoprotein lipase promoting agent, on homozygous and heterozygous Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Arzneimittelforschung*. 50, 118-121.
- Tsutsumi,K., Inoue,Y., Shima,A., Iwasaki,K., Kawamura,M., and Murase,T. (1993). The novel compound NO-1886 increases lipoprotein lipase activity with resulting elevation of high density lipoprotein cholesterol, and long-term administration inhibits atherogenesis in the coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis. *J. Clin. Invest* 92, 411-417.
- Uchida,Y., Irie,K., Tsukahara,F., Ohba,K., Ogawa,A., Fujii,E., and Muraki,T. (1995). Endothelin-1, but not endothelin-3, suppresses lipoprotein lipase gene expression in brown adipocytes differentiated in culture. *Eur. J. Pharmacol.* 291, 33-41.
- Ueland,P.M. and Refsum,H. (1989). Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J. Lab Clin. Med.* 114, 473-501.

Van Eck,M., Zimmermann,R., Groot,P.H., Zechner,R., and Van Berkel,T.J. (2000). Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, E53-E62.

Van Tits,L., De Graaf,J., Hak-Lemmers,H., Bredie,S., Demacker,P., Holvoet,P., and Stalenhoef,A. (2003). Increased levels of low-density lipoprotein oxidation in patients with familial hypercholesterolemia and in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Lab Invest* *83*, 13-21.

Vehmaan-Kreula,P., Puolakkainen,M., Sarvas,M., Welgus,H.G., and Kovanen,P.T. (2001). Chlamydia pneumoniae proteins induce secretion of the 92-kDa gelatinase by human mono. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *21*, E1-E8.

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

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

Verma,S., Li,S.H., Badiwala,M.V., Weisel,R.D., Fedak,P.W., Li,R.K., Dhillon,B., and Mickle,D.A. (2002a). Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 105, 1890-1896.

Verma,S., Wang,C.H., Li,S.H., Dumont,A.S., Fedak,P.W., Badiwala,M.V., Dhillon,B., Weisel,R.D., Li,R.K., Mickle,D.A., and Stewart,D.J. (2002b). A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106, 913-919.

Viles-Gonzalez,J.F., Fuster,V., Corti,R., and Badimon,J.J. (2003). Emerging importance of HDL cholesterol in developing high-risk coronary plaques in acute coronary syndromes. *Curr. Opin. Cardiol.* 18, 286-294.

Visser,M., Bouter,L.M., McQuillan,G.M., Wener,M.H., and Harris,T.B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282, 2131-2135.

Vlassara,H. (1994). Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J. Lab Clin. Med.* 124, 19-30.

Vlassara,H., Brownlee,M., Manogue,K.R., Dinarello,C.A., and Pasagian,A. (1988). Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 240, 1546-1548.

Vlassara,H., Bucala,R., and Striker,L. (1994). Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70, 138-151.

Vlassara,H. and Palace,M.R. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *J. Intern. Med.* 251, 87-101.

Voutilainen,S., Morrow,J.D., Roberts,L.J., Alfthan,G., Alho,H., Nyysönen,K., and Salonen,J.T. (1999). Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1263-1266.

Walker,A.B., Chattington,P.D., Buckingham,R.E., and Williams,G. (1999). The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes* 48, 1448-1453.

Wang,B.R. and Liu,N.F. (2001). Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes by exposure to advanced glycosylation end products. *Acta Pharmacol. Sin.* 22, 67-70.

Wang,G. and O K (2001). Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem. J.* 357, 233-240.

Watanabe,Y., Sunayama,S., Shimada,K., Sawano,M., Hoshi,S., Iwama,Y., Mokuno,H., Daida,H., and Yamaguchi,H. (2000). Troglitazone improves endothelial dysfunction in patients with insulin resistance. *J. Atheroscler. Thromb.* 7, 159-163.

Wautier,J.L. and Guillausseau,P.J. (1998). Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vasc. Med.* 3, 131-137.

Wautier,M.P., Chappey,O., Corda,S., Stern,D.M., Schmidt,A.M., and Wautier,J.L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 280, E685-E694.

Weinstock,P.H., Levak-Frank,S., Hudgins,L.C., Radner,H., Friedman,J.M., Zechner,R., and Breslow,J.L. (1997). Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10261-10266.

Weiss,N., Heydrick,S.J., Postea,O., Keller,C., Keaney,J.F., Jr., and Loscalzo,J. (2003). Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state--impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin. Chem. Lab Med.* 41, 1455-1461.

Welch,G.N., Upchurch,G.R., Jr., and Loscalzo,J. (1997). Homocysteine, oxidative stress, and vascular disease. *Hosp. Pract. (Off Ed)* 32, 81-92.

Weyer,C., Funahashi,T., Tanaka,S., Hotta,K., Matsuzawa,Y., Pratley,R.E., and Tataranni,P.A. (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 1930-1935.

White,J.R., Chait,A., Klebanoff,S.J., Deeb,S., and Brunzell,J.D. (1988). Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumor necrosis factor. *J. Lipid Res.* 29, 1379-1385.

Wilcken,D.E., Wang,X.L., Adachi,T., Hara,H., Duarte,N., Green,K., and Wilcken,B. (2000). Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1199-1202.

Wilkes,H.C., Kelleher,C., and Meade,T.W. (1988). Smoking and plasma fibrinogen. *Lancet* 1, 307-308.

Wilson,K., Fry,G.L., Chappell,D.A., Sigmund,C.D., and Medh,J.D. (2001). Macrophage-specific expression of human lipoprotein lipase accelerates atherosclerosis in transgenic apolipoprotein e knockout mice but not in C57BL/6 mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1809-1815.

Wolffenbuttel,B.H. (1993). The DCCT: "metabolic control matters". *Diabetes Control and Complications Trial. Neth. J. Med.* 43, 241-245.

Woo,C.W., Cheung,F., Chan,V.W., Siow,Y.L., and O K (2003). Homocysteine stimulates inducible nitric oxide synthase expression in macrophages: antagonizing effect of ginkgolides and bilobalide. *Mol. Cell Biochem.* 243, 37-47.

Woo,D.K., Dudrick,S.J., and Sumpio,B.E. (2000). Homocysteine stimulates MAP kinase in bovine aortic smooth muscle cells. *Surgery* 128, 59-66.

Worthley,S.G., Osende,J.I., Helft,G., Badimon,J.J., and Fuster,V. (2001). Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt. Sinai J. Med.* 68, 167-181.

Wu,C.H., Chang,C.H., Lin,H.C., Chen,C.M., Lin,C.H., and Lee,H.M. (2003). Role of protein kinase C in BSA-AGE-mediated inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 66, 203-212.

Wu,C.H., Huang,C.M., Lin,C.H., Ho,Y.S., Chen,C.M., and Lee,H.M. (2002). Advanced glycosylation end products induce NF-kappaB dependent iNOS expression in RAW 264.7 cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 194, 9-17.

Wyne,K.L. (2003). Free fatty acids and type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 115 *Suppl* 8A, 29S-36S.

Yardim-Akaydin,S., Ozkan,Y., Ozkan,E., Torun,M., and Simsek,B. (2003). The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Clin. Chim. Acta* 338, 99-105.

Yasojima,K., Schwab,C., McGeer,E.G., and McGeer,P.L. (2000). Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 887, 80-89.

Yeh,C.H., Sturgis,L., Haidacher,J., Zhang,X.N., Sherwood,S.J., Bjercke,R.J., Juhasz,O., Crow,M.T., Tilton,R.G., and Denner,L. (2001). Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50, 1495-1504.

Yeh,E.T. and Willerson,J.T. (2003). Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation* 107, 370-371.

Yin,W., Liao,D., Kusunoki,M., Xi,S., Tsutsumi,K., Wang,Z., Lian,X., Koike,T., Fan,J., Yang,Y., and Tang,C. (2004b). NO-1886 decreases ectopic lipid deposition and protects pancreatic beta cells in diet-induced diabetic swine. *J. Endocrinol.* 180, 399-408.

Yin,W., Liao,D., Wang,Z., Xi,S., Tsutsumi,K., Koike,T., Fan,J., Yi,G., Zhang,Q., Yuan,Z., and Tang,K. (2004a). NO-1886 inhibits size of adipocytes, suppresses plasma levels of

tumor necrosis factor-alpha and free fatty acids, improves glucose metabolism in high-fat/high-sucrose-fed miniature pigs. *Pharmacol. Res.* 49, 199-206.

Yudkin,J.S. (2003). Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 27 *Suppl 3*, S25-S28.

Yudkin,J.S., Stehouwer,C.D., Emeis,J.J., and Coppack,S.W. (1999). C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 972-978.

Zeng,X., Dai,J., Remick,D.G., and Wang,X. (2003). Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ. Res.* 93, 311-320.

Zhang,C., Kawauchi,J., Adachi,M.T., Hashimoto,Y., Oshiro,S., Aso,T., and Kitajima,S. (2001b). Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 718-724.

Zhang,H.S., Cao,E.H., and Qin,J.F. (2003). Intracellular redox status modulates monocyte chemoattractant protein-1 expression stimulated by homocysteine in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42, 258-265.

Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K., and Mangelsdorf, D.J. (2001a). Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J. Biol. Chem.* 276, 43018-43024.

Zilversmit, D.B. (1995). Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin. Chem.* 41, 153-158.

Zou, Y., Hu, Y., Metzler, B., and Xu, Q. (1998). Signal transduction in arteriosclerosis: mechanical stress-activated MAP kinases in vascular smooth muscle cells (review). *Int. J. Mol. Med.* 1, 827-834.