

Université de Montréal

**Régulation de la lipoprotéine lipase  
macrophagique et de LOX-1 par des facteurs  
métaboliques. Implications dans l'athérosclérose  
associée au diabète de type 2.**

par

Fritz Maingrette

Département de nutrition

Faculté de médecine

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

décembre 2007

©Fritz Maingrette, 2007

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique et de LOX-1 par des facteurs métaboliques. Implications dans l'athérosclérose associée au diabète de type 2.

présentée par :  
Fritz Maingrette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jane Montgomery, président-rapporteur  
Geneviève Renier, directeur de recherche  
Hugues Beauregard, membre du jury  
Pierre Julien, examinateur externe  
Parviz Ghadirian, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de décès dans les pays occidentaux et constituent la principale complication associée au diabète. La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme clé du métabolisme des lipides et est responsable de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides (TG). Plusieurs études ont démontré que la LPL sécrétée par les macrophages dans la paroi artérielle est pro-athérogénique.

La dysfonction endothéliale caractérise les stades précoces du processus athérosclérotique. Il a été observé qu'un récepteur nouvellement identifié des lipoprotéines de basse densité oxydées (LDLox), le récepteur de type lectine des LDLox (LOX-1), est fortement exprimé dans les lésions athérosclérotiques humaines et dans l'aorte de rats diabétiques, suggérant un rôle clé de LOX-1 dans la pathogénèse de l'athérosclérose diabétique.

Au vu du rôle potentiel de la LPL macrophagique et du LOX-1 dans l'athérosclérose associée au diabète de type 2, nous avons évalué la régulation de ces deux molécules pro-athérogéniques par des facteurs métaboliques et inflammatoires augmentés dans le diabète, soit la leptine, l'acide linoléique (LA) et la protéine C-réactive (CRP). Nos résultats démontrent que : 1) Dans les cellules endothéliales aortiques humaines (HAECs), LA augmente l'expression protéique de LOX-1 de façon temps- et dose-dépendante; 2) La pré-incubation de HAECs avec des antioxydants et des inhibiteurs de la NADPH oxydase, de la protéine

kinase C (PKC) et du facteur nucléaire-kappa B (NF-kB), inhibe l'effet stimulant de LA sur l'expression protéique de LOX-1; 3) Dans les HAECs traitées avec LA, on observe une augmentation d'expression des isoformes classiques de la PKC; 4) LA augmente de manière significative l'expression génique de LOX-1 ainsi que la liaison des protéines nucléaires extraites des HAECs à la séquence régulatrice NF-kB présente dans le promoteur du gène de LOX-1; 5) LA augmente, via LOX-1, la captation des LDLox par les cellules endothéliales. Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que LA augmente l'expression endothéliale de LOX-1 in vitro et appuient le rôle clé de LA dans la dysfonction endothéliale associée au diabète.

Au vu de nos études antérieures démontrant qu'une expression accrue de LPL macrophagique chez les patients diabétiques de type 2 et que l'augmentation de facteurs métaboliques dans cette maladie, soit l'homocystéine (Hcys), les acides gras et les produits terminaux de glycation (AGE), accroissent l'expression de la LPL macrophagique, nous avons par la suite déterminé l'effet, in vitro, de deux autres facteurs métaboliques et inflammatoires surexprimés dans le diabète, soit la leptine et la CRP, sur l'expression de la LPL macrophagique.

Les concentrations plasmatiques de leptine sont élevées chez les patients diabétiques et sont associées à un accroissement des risques cardiovasculaires. Nous avons démontré que : 1) Dans les macrophages humains, la leptine augmente l'expression de la LPL, tant au niveau génique que protéique; 2) L'effet

stimulant de la leptine sur la LPL est aboli par la pré-incubation avec un anticorps dirigé contre les récepteurs à la leptine (Ob-R), des inhibiteurs de la PKC et des antioxydants; 3) La leptine augmente l'expression membranaire des isoformes classiques de la PKC et la diminution de l'expression endogène de la PKC, abolit l'effet de la leptine sur l'expression de la LPL macrophagique; 4) Dans les macrophages murins, la leptine augmente le taux de synthèse de la LPL et augmente la liaison de protéines nucléaires à la séquence protéine activée-1 (AP-1) du promoteur du gène de la LPL. Ces observations supportent la possibilité que la leptine puisse représenter un facteur stimulant de la LPL macrophagique dans le diabète.

Finalement, nous avons déterminé, *in vitro*, l'effet de la CRP sur l'expression de la LPL macrophagique. La CRP est une molécule inflammatoire et un puissant prédicteur d'événements cardiovasculaires. Des concentrations élevées de CRP sérique sont documentées chez les patients diabétiques de type 2. Nous avons démontré que : 1) Dans les macrophages humains, la CRP augmente l'expression de la LPL au niveau génique et protéique et la liaison de la CRP aux récepteurs CD32 est nécessaire pour médier ses effets; 2) La pré-incubation de macrophages humains avec des antioxydants, des inhibiteurs de la PKC et de la protéine kinase mitogénique activée (MAPK), prévient l'induction de la LPL par la CRP; 3) La CRP augmente l'activité de la LPL, la génération intracellulaire d'espèces radicalaires oxygénées (ROS), l'expression d'isoformes classiques de la PKC et la phosphorylation des kinases extracellulaires régulées 1/2 (ERK 1/2); 4)

Les macrophages murins traités avec la CRP démontrent une augmentation de la liaison des protéines nucléaires à la séquence AP-1 du promoteur du gène de la LPL. Ces données suggèrent que la LPL puisse représenter un nouveau facteur médiant les effets délétères de la CRP dans la vasculopathie diabétique.

Dans l'ensemble nos études démontrent le rôle clé de facteurs métaboliques et inflammatoires dans la régulation vasculaire de la LPL et du LOX-1 dans le diabète. Nos données suggèrent que la LPL et le LOX-1 puissent représenter des contributeurs clé de l'athérogénèse accélérée associée au diabète chez l'humain.

**Mots-clés** : athérosclérose, maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, macrophage, LPL, cellules endothéliales, LOX-1, stress oxydatif, leptine, LA, CRP.

## Abstract

Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of death in western countries and is the major complication of diabetes. Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipid metabolism, responsible for the hydrolysis of triglyceride (TG) rich lipoproteins. Many studies have shown that LPL secreted by macrophages in the arterial wall is proatherogenic.

Endothelial dysfunction is a characteristic feature of early-stage atherosclerosis. The observation that lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), a newly identified receptor for oxidized LDL (oxLDL), is highly expressed in human atherosclerotic lesions and upregulated in the aorta of diabetic rats, suggests a key role for LOX-1 in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis.

Based on the role of macrophage LPL and LOX-1 in atherosclerosis, we sought to investigate the regulation of these two proatherogenic molecules by metabolic and inflammatory factors dysregulated in diabetes namely leptin, linoleic acid (LA) and C-reactive protein (CRP). Our results demonstrated that: 1) In human aortic endothelial cells (HAECs), LA increased LOX-1 protein expression in a time- and dose-dependent manner; 2) Pretreatment of HAECs with antioxidants and inhibitors of NADPH oxidase, protein kinase C (PKC), and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inhibited the stimulatory effect of LA on LOX-1 protein expression; 3) Increased expression of classic PKC isoforms was observed in LA-treated HAECs; 4) LA led to a significant increase in LOX-1 gene expression and enhanced the

binding of nuclear proteins extracted from HAECs to the NF- $\kappa$ B regulatory element of the LOX-1 gene promoter; 5) LA enhanced, through LOX-1, oxLDL uptake by endothelial cells. Overall, these results demonstrated that LA enhances endothelial LOX-1 expression in vitro and support a key role for LA in endothelial dysfunction associated with diabetes.

Based on our previous studies showing that macrophage LPL expression is increased in patients with type 2 diabetes and that metabolic factors dysregulated in this disease such as glucose, homocysteine (Hcys), fatty acids and advanced glycation end products (AGE), increased macrophage LPL expression, we next determined the effect of two other metabolic and inflammatory factors dysregulated in diabetes, namely leptin and CRP, on macrophage LPL expression in vitro.

Leptin levels are elevated in diabetic patients and are associated with greater cardiovascular risks. We found that: 1) In human macrophages, leptin increased LPL expression, at both the gene and protein levels; 2) The stimulatory effect of leptin on LPL was abolished by pre-treatment with anti-leptin receptor (Ob-R) antibody, PKC inhibitors and antioxidants; 3) Leptin increased the membrane expression of conventional PKC isoforms and downregulation of endogenous PKC expression abolished the effects of leptin on macrophage LPL expression; 4) In murine macrophages, leptin raised LPL synthetic rate and enhanced the binding of nuclear proteins to the activated protein-1 (AP-1) sequence of the LPL gene promoter. These observations support the possibility that leptin may represent a macrophage LPL stimulatory factor in diabetes.



Finally, we sought to determine the effect of CRP on macrophage LPL expression in vitro. CRP is an inflammatory molecule and a strong predictor of cardiovascular events and high serum levels of CRP are observed in type 2 diabetic patients. We found that: 1) In human macrophages, CRP increased LPL expression at the gene and protein levels and CRP binding to CD32 receptors is required for these effects; 2) Preincubation of human macrophages with antioxidants, PKC and mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitors, prevented the CRP-induced LPL expression; 3) CRP increased LPL activity, intracellular reactive oxygen species (ROS) generation, classic PKC isozymes expression and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 phosphorylation; 4) CRP-treated murine macrophages demonstrated increased binding of nuclear proteins to the AP-1 sequence of the LPL gene promoter. These data suggest that LPL might represent a novel factor underlying the adverse effect of CRP on the diabetic vasculature.

Overall, our studies indicate a key role of metabolic and inflammatory factors in the regulation of vascular LPL and LOX-1 in diabetes. Our data suggest that LPL and LOX-1 are key contributors to the accelerated atherogenesis associated with human diabetes.

**Keywords :** atherosclerosis, cardiovascular diseases, type 2 diabetes, macrophage, LPL, endothelial cells, LOX-1, oxidative stress, leptin, LA, CRP.





|   |    |
|---|----|
| I.2.5.2.3.2.2 Résistine .....   | 53 |
| I.2.5.2.3.2.3 Adiponectine .....  | 53 |
| I.2.5.2.3.2.4 Visfatine .....   | 54 |
| I.2.5.2.3.2.5 Leptine .....   | 54 |
| I.2.5.2.3.1.6.1 Leptine et diabète .....  | 56 |
| I.2.5.2.3.1.6.2 Leptine et athérosclérose .....   | 58 |
| I.2.6 Complications micro-vasculaires du diabète de type 2 .....  | 66 |
| I.2.6.1 Néphropathie .....  | 66 |
| I.2.6.2 Rétinopathie .....  | 67 |
| I.2.6.3 Neuropathie .....   | 67 |
| I.2.7 Complications macro-vasculaires du diabète de type 2 .....  | 67 |
| I.2.7.1 Facteurs de risque traditionnels .....  | 69 |
| I.2.7.1.1 Hyperglycémie .....   | 69 |
| I.2.7.1.2 Dyslipidémies .....   | 70 |
| I.2.7.1.3 Hypertension .....  | 71 |
| I.2.7.1.4 Tabagisme .....   | 71 |
| I.2.7.1.5 Obésité .....   | 71 |
| I.2.7.2 Nouveaux facteurs de risque et mécanismes<br>physiopathologiques .....  | 72 |
| I.2.7.2.1 Dysfonction endothéliale .....  | 72 |
| I.2.7.2.2 Altérations de la coagulation .....   | 73 |
| I.2.7.2.3 Stress oxydatif .....   | 73 |
| I.2.7.2.4 IR .....  | 74 |
| I.2.7.2.5 Inflammation systémique .....   | 77 |
| I.2.8 L'inflammation: le chaînon manquant reliant l'insulino-résistance,<br>l'obésité, le diabète de type 2 et l'athérosclérose ..... | 78 |
| I.2.8.1 Inflammation et obésité .....   | 78 |
| I.2.8.2 Inflammation et IR .....  | 80 |
| I.2.8.3 Inflammation et diabète de type 2 .....   | 81 |

|  |     |
|--|-----|
| I.2.8.4 Inflammation et athérosclérose .....                   | 83  |
| I.3 Lipoprotéine lipase (LPL) .....                            | 85  |
| I.3.1 Structure du gène de la LPL .....                        | 85  |
| I.3.1.1 Régulation transcriptionnelle de la LPL.....           | 87  |
| I.3.1.2 Régulation post-transcriptionnelle de la LPL.....      | 89  |
| I.3.2 Structure de la protéine.....                            | 90  |
| I.3.2.1 Synthèse et maturation .....                           | 90  |
| I.3.2.2 Structure homodimérique .....                          | 91  |
| I.3.2.3 Site catalytique .....                                 | 92  |
| I.3.2.4 Site de liaison lipidique.....                         | 93  |
| I.3.2.5 Site de liaison à l'héparine .....                     | 94  |
| I.3.2.6 Site de liaison aux récepteurs .....                   | 94  |
| I.3.2.7 Rôle de la LPL dans le métabolisme des lipides.....    | 95  |
| I.3.3 Régulation de l'expression de la LPL .....               | 97  |
| I.3.3.1 Expression tissulaire de la LPL .....                  | 97  |
| I.3.3.2 Régulateurs physiologiques de la LPL .....             | 98  |
| I.3.3.2.1 Jeûne, état post-prandial et activité physique ..... | 98  |
| I.3.3.2.2 Régulation hormonale .....                           | 100 |
| I.3.3.2.2.1 Stéroïdes.....                                     | 100 |
| I.3.3.2.2.2 Insuline .....                                     | 100 |
| I.3.3.2.2.3 Hormone de croissance .....                        | 103 |
| I.3.3.2.2.4 Thyroxine .....                                    | 104 |
| I.3.3.2.2.5 Prolactine .....                                   | 105 |
| I.3.3.2.2.6 Catécholamines.....                                | 105 |
| I.3.3.2.2.7 Hormones sexuelles.....                            | 105 |
| I.3.3.2.3 Régulation par les cytokines pro-inflammatoires..... | 106 |
| I.3.3.2.3.1 TNF- $\alpha$ .....                                | 106 |
| I.3.3.2.3.2 IFN- $\gamma$ .....                                | 107 |
| I.3.3.2.3.3 IL-1 .....   | 107 |

|   |     |
|---|-----|
| I.3.3.2.3.4 IL-6 .....  | 108 |
| I.3.3.2.3.5 Lipopolysaccharide (LPS).....                                   | 108 |
| I.3.3.3 LPL et pathologies .....  | 110 |
| I.3.3.3.1 LPL et obésité .....  | 110 |
| I.3.3.3.2 LPL et IR .....   | 111 |
| I.3.3.3.3 LPL et diabète de type 2 .....                                    | 113 |
| I.3.3.3.4 LPL et inflammation .....   | 116 |
| I.3.3.3.5 LPL et athérosclérose .....                                       | 117 |
| I.3.3.3.5.1 Propriétés anti-athérogéniques<br>de la LPL .....               | 117 |
| I.3.3.3.5.2 Propriétés pro-athérogéniques<br>de la LPL .....                | 119 |
| I.3.3.3.5.3 Mécanismes pro-athérogéniques<br>de la LPL macrophagique .....  | 120 |
| I.4 Récepteur de type lectine des LDLox-1 (LOX-1) .....                     | 122 |
| I.4.1 Structure, organisation et analyse du promoteur<br>du gène LOX-1..... | 124 |
| I.4.2 Structure de la protéine.....   | 125 |
| I.4.2.1 Structures et fonctions des domaines de LOX-1 .....                 | 126 |
| I.4.2.2 Modifications post-translationnelles de LOX-1 .....                 | 126 |
| I.4.2.3 Formes solubles de LOX-1 .....                                      | 127 |
| I.4.3 Distribution tissulaire de LOX-1.....                                 | 128 |
| I.4.4 Ligands de LOX-1 .....  | 128 |
| I.4.5 Régulation de l'expression de LOX-1 .....                             | 129 |
| I.4.5.1 Cytokines pro-inflammatoires.....                                   | 129 |
| I.4.5.2 Stimuli pro-athérosclérotiques.....                                 | 129 |
| I.4.5.3 Stress oxydatif.....  | 130 |
| I.4.5.4 Médicaments.....  | 132 |
| I.4.6 Rôle de LOX-1 dans des états pathologiques.....                       | 133 |
| I.4.6.1 LOX-1 et dysfonction endothéliale .....                             | 133 |

|   |     |
|---|-----|
| I.4.6.2 LOX-1 et athérosclérose .....   | 134 |
| I.4.6.3 LOX-1 et diabète .....  | 138 |
| I.4.6.4 LOX-1 et hypertension .....   | 138 |
| I.4.6.5 LOX-1 et inflammation/réponse immunitaire .....   | 139 |
| I.4.6.6 LOX-1 et dommage myocardique d'ischémie-reperfusion .....   | 140 |
| I.4.6.7 LOX-1 et arthrite rhumatoïde et ostéoarthrite .....   | 140 |
| I.5 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL .....  | 142 |
| II. Résultats .....   | 145 |
| II.1 Premier article : Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: Involvement of oxidative stress and Protein kinase C ..... | 146 |
| II.2 Deuxième article: Linoleic acid increases lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in human aortic endothelial cells .....   | 184 |
| II.3 Troisième article : C-reactive protein enhances macrophage lipoprotein lipase expression .....   | 223 |
| III. Discussion.....  | 270 |
| III.1 Diabète de type 2 et MCV .....  | 270 |
| III.2 Importance de la LPL macrophagique dans le processus athéromateux .....   | 272 |
| III.2.1 Régulation de la LPL macrophagique par la leptine.....  | 273 |
| III.2.2 Régulation de la LPL macrophagique par la CRP .....   | 280 |
| III.3 Importance de LOX-1 dans la dysfonction endothéliale .....  | 290 |
| III.3.1 Régulation endothéliale de LOX-1 par LA .....   | 291 |
| IV. Conclusion.....   | 304 |
| V. Perspectives .....   | 305 |
| VI. Bibliographie.....  | 310 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau I. Mécanismes pathophysiologiques contribuant aux MCV associées<br>au diabète de type 2 ..... | 69  |
| Tableau II. Éléments de réponse présents dans le promoteur du gène de la<br>LPL.....                  | 89  |
| Tableau III. Régulateurs physiologiques de la LPL.....  | 109 |



## Liste des figures

### Introduction :

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Stades du développement de l'athérosclérose.....   | 3   |
| Figure 2. Mécanismes partagés par l'IR et la dysfonction endothéliale mettant<br>en lumière leur réciprocity.....        | 10  |
| Figure 3. Rôle de LA dans la dysfonction endothéliale.....   | 20  |
| Figure 4. Taux sériques de CRP et risques d'accidents cardio-vasculaires....   | 36  |
| Figure 5. Pathophysiologie du diabète de type 2.....   | 40  |
| Figure 6. L'inflammation : le chaînon manquant reliant l'IR, l'obésité, le diabète<br>de type 2 et l'athérosclérose..... | 84  |
| Figure 7. Rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose.....   | 137 |

### Premier article :

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Dose-dependent effect of leptin on human macrophage extracellular<br>LPL immunoreactive mass (A) and activity (B)..... | 164 |
| Figure 2. Effect of leptin on human macrophage LPL mRNA expression.....  | 165 |
| Figure 3. Effect of Ob-R antibody on human macrophage extracellular LPL<br>immunoreactive mass (A) and activity (B).....         | 166 |
| Figure 4. Effect of PKC inhibitor on human macrophage extracellular LPL<br>immunoreactive mass (A) and activity (B).....         | 167 |
| Figure 5. Effect of antioxidant and PKC inhibitor on leptin-stimulated murine<br>macrophage LPL gene expression.....             | 168 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 6. Effect of leptin on conventional PKC isoform expression.....  | 169 |
| Figure 7. Effect of leptin on murine macrophage LPL synthetic rate.....   | 170 |
| Figure 8. Effect of leptin on the binding of nuclear proteins extracted from<br>murine macrophages to the regulatory AP-1 sequence of the LPL<br>gene promoter..... | 171 |

**Deuxième article:**

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Effect of LA on endothelial LOX-1 mRNA expression.....   | 199 |
| Figure 2. Time- and dose-dependent effect of LA on endothelial LOX-1 protein<br>expression.....  | 200 |
| Figure 3. Effect of antioxidants on LA-induced LOX-1 protein expression.....   | 202 |
| Figure 4. Effect of NADPH oxidase and mitochondrial electron transport chain<br>inhibitors on LA-induced LOX-1 protein expression..... | 203 |
| Figure 5. Effect of PKC, NF- $\kappa$ B and activator protein 1 (AP-1) inhibitors on LA-<br>induced LOX-1 protein expression.....      | 204 |
| Figure 6. Effect of LA on PKC expression.....  | 205 |
| Figure 7. Effect of LA on the binding of nuclear proteins to the regulatory NF- $\kappa$ B<br>sequence of the LOX-1 gene promoter..... | 206 |
| Figure 8. Effect of LA on oxLDL uptake by endothelial cells.....   | 207 |

**Troisième article:**

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Effect of nCRP on human macrophage LPL protein expression.....   | 239 |
| Figure 2. Effect of nCRP vs. mCRP on human macrophage LPL protein<br>expression.....   | 241 |
| Figure 3. Role of FcγRII receptor on CRP-induced human macrophage LPL<br>protein expression.....   | 243 |
| Figure 4. Role of oxidative stress on CRP-stimulated human macrophage LPL<br>expression.....   | 244 |
| Figure 5. Role of PKC on CRP-stimulated human macrophage LPL<br>expression.....  | 246 |
| Figure 6. Role of MAPK on CRP-induced human macrophage LPL<br>expression.....  | 248 |
| Figure 7. Effect of CRP on murine macrophage LPL gene expression.<br>Role of oxidative stress, PKC and MAPK.....                                   | 250 |
| Figure 8. Effect of CRP on the binding of nuclear proteins extracted from J774<br>cells to the regulatory AP-1 sequence of the LPL gene promoter.. | 252 |

**Discussion :**

|  |     |
|--|-----|
| Figure 8. Mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression<br>de la LPL macrophagique en réponse à la leptine et à la CRP et dans<br>l'expression endothéliale de LOX-1 par LA dans le diabète de type<br>2..... | 298 |
|--|-----|

Figure 9. Résumé des interactions entre obésité, inflammation, IR et dysfonction endothéliale. Implication de la LPL macrophagique et de LOX-1 dans la vasculopathie diabétique qui en résulte..... 300

## Liste des abréviations

**ACE** : enzyme de conversion de l'angiotensine

**ACV** : accident cardiovasculaire

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADP** : adénosine diphosphate

**AGE** : produits terminaux de glycation

**AGL** : acides gras libres

**AGNE** : acides gras non estérifiés

**Akt** : protéine kinase B

**ALA** : acide alpha-linolénique

**AMPK** : protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate 5'

**AngII** : angiotensine II

**AP-1** : protéine activée-1

**apo (a)** : apolipoprotéine (a)

**apo CII** : apolipoprotéine CII

**CML** : cellules musculaires lisses

**CRD** : domaine de reconnaissance des hydrates de carbone

**CRP** : protéine C-réactive

**15d-PGJ(2)** : 15-déoxy-Delta (12-14)-prostaglandine J(2)

**DHA** : acide docosahexaénoïque

**ELAM-1** : E-sélectine

**eNOS** : oxyde nitrique synthase endothéliale

**ET-1** : endothéline-1

**EPA** : acide eicosapentaénoïque

**ERK 1/2** : kinases extracellulaires régulées 1/2

**FGF** : facteur de croissance des fibroblastes

**GH** : hormone de croissance

**HAECs** : cellules endothéliales aortiques humaines

**Hcys** : homocystéine

**HDL**: lipoprotéines de haute densité

**HOPDE** : acide hydroperoxyoctadécadiénoïque

**HPETE** : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque

**HSPG** : héparan sulfate protéoglycan

**hsCRP** : CRP hautement sensible

**ICAM-1**: molécule d'adhésion intercellulaire-1

**IGF-1** : facteur de croissance de l'insuline

**IKK $\beta$**  : I kappa B kinase bêta

**IL-1** : interleukine-1

**IL-1 $\beta$**  : interleukine-1 bêta

**IL-6** : interleukine-6

**IL-8** : interleukine-8

**IL-11** : interleukine-11

**IMC** : indice de masse corporelle

**IMT** : épaisseur de l'intima-media carotidienne

**IFN- $\gamma$**  : interféron-gamma

**iNOS** : forme inductible des synthases du monoxyde d'azote

**IP-10** : protéine-10 induite par l'IFN- $\gamma$

**IRAK1** : kinase associée au récepteur de l'IL-1

**IR** : insulino-résistance

**IRS-1** : substrat du récepteur de l'insuline-1

**8-iso-PGF2 $\alpha$**  : 8-iso-prostaglandine F2 alpha

**JAK/STAT** : Janus kinases/protéines de transduction et de régulation de la transcription

**JNK** : kinases c-jun N-terminal

**LA** : acide linoléique

**LDL** : lipoprotéines de basse densité

**LDLox** : lipoprotéines de basse densité oxydées

**LOX-1** : récepteur de type lectine des lipoprotéines de basse densité oxydées

**Lp(a)** : lipoprotéine (a)

**Lp $\alpha$**  : lipoprotéine  $\alpha$

**Lp $\beta$**  : lipoprotéine  $\beta$

**LPC** : lysophosphatidylcholine

**LPL** : lipoprotéine lipase

**Lp-PLA<sub>2</sub>** : lipoprotéine-phospholipase A<sub>2</sub>

**LPS** : lipopolysaccharide

**LRP** : protéine reliée au récepteur des LDL

**LXR** : récepteur hépatique X

**MAPK**: protéine kinase mitogénique activée

**MCP-1**: protéine chémoattractive monocytaire-1

**M-CSF** : facteur macrophagique stimulant des colonies

**MCV** : maladies cardiovasculaires

**MMP** : métalloprotéinase de la matrice

**MPO** : myeloperoxydase

**NAC** : N-acetylcystéine

**NADPH oxydase** : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate oxydase

**NF-1** : facteur nucléaire-1

**NF-3** : facteur nucléaire-3

**NF-kB** : facteur nucléaire-kappa B

**NF-Y** : facteur nucléaire-Y

**NO** : oxyde nitrique

**OA** : acide oléique

**PAI-1** : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1

**PBMC** : cellules mononucléaires périphériques sanguines

**PDGF** : facteur de croissance dérivé des plaquettes

**PKC-1** : kinase dépendante des phosphoinositides-1

**PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase

**PI-3K** : phosphatidylinositol-3kinase

**PKC** : protéine kinase C



**PMA** : phorbol 12-myristate 13-acétate

**PON 1** : paraoxonase 1

**PPAR** : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

**PS** : phosphatidylsérine

**RAGE** : récepteur des produits terminaux de glycation

**RAP** : protéine associée au récepteur

**RAS** : système rénine-angiotensine

**RBX** : ruboxistaurin

**RE** : réticulum endoplasmique

**RNAi** : interférence d'ARN

**ROS** : espèces radicalaires oxygénées

**RXR** : récepteur de l'acide rétinoïque

**SAA** : amyloïde sérique A

**SOCS** : suppresseurs de signalisation de l'insuline

**Sp** : protéines de spécificité

**SR-A** : récepteur scavenger-A

**SREBP-1** : élément de régulation des stérols-1

**SRE** : élément régulé par les stérols

**SSRE** : élément de réponse au stress de cisaillement

**sTM** : thrombomoduline soluble

**TBARS** : substances réactives à l'acide thiobarbiturique

**TF** : facteur tissulaire

**TG** : triglycérides

**TGF- $\beta$**  : facteur de croissance transformant bêta

**TNF $\alpha$**  : facteur de nécrose tumorale alpha

**TPA** : 12-O-Tétradécanoylphorbol 13-acétate

**TRE** : élément de réponse au TPA

**t-PA** : activateur du plasminogène tissulaire

**Trp** : tryptophane

**TZDs** : thiazolidinediones

**UKPDS** : "*United Kingdom Prospective Diabetes Study*"

**VCAM-1** : molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1

**VEGF** : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**VLDL** : lipoprotéine de très basse densité

**vWF** : facteur de von Willebrand

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement ma famille et mes amis pour leur amour, leur empathie, leur compréhension, leur support dans les moments difficiles et leurs précieux conseils.

Merci à tous les membres du laboratoire que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de mes études et qui avez su rendre cette expérience agréable et enrichissante. Ling, Jean-Claude, Marie-Claude, vous êtes à tout jamais gravés dans mon cœur. Merci aux étudiants de l'ICM pour leur accueil chaleureux et pour avoir su égayer mes journées.

Finalement, un grand merci à Katia, sans toi tout ceci n'aurait jamais été possible.

*À ma mère, Gerda*

# **I. Introduction**

## **I.1 ATHÉROSCLÉROSE**

### **I.1.1 Généralités**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la principale cause de maladie et de décès dans les pays industrialisés et représentent un problème de santé majeur qui atteint des proportions épidémiques (McDermott, 2007). L'athérosclérose est une pathologie des grosses et moyennes artères, se caractérisant par l'accumulation de lipides, de cellules musculaires lisses (CML) et d'éléments fibreux dans la paroi artérielle. Il est maintenant largement accepté que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire se développant grâce à des interactions entre les lipoprotéines plasmatiques, les cellules vasculaires, incluant les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les CML et la matrice extracellulaire de la paroi artérielle (Tiong & Brieger, 2005).

### **I.1.2 Les 4 stades de l'athérosclérose**

L'athérosclérose est une maladie progressive qui se déroule en 4 étapes : la dysfonction endothéliale, la strie lipidique, la lésion avancée ou compliquée et la plaque fibreuse instable, tel qu'illustré à la Figure 1.

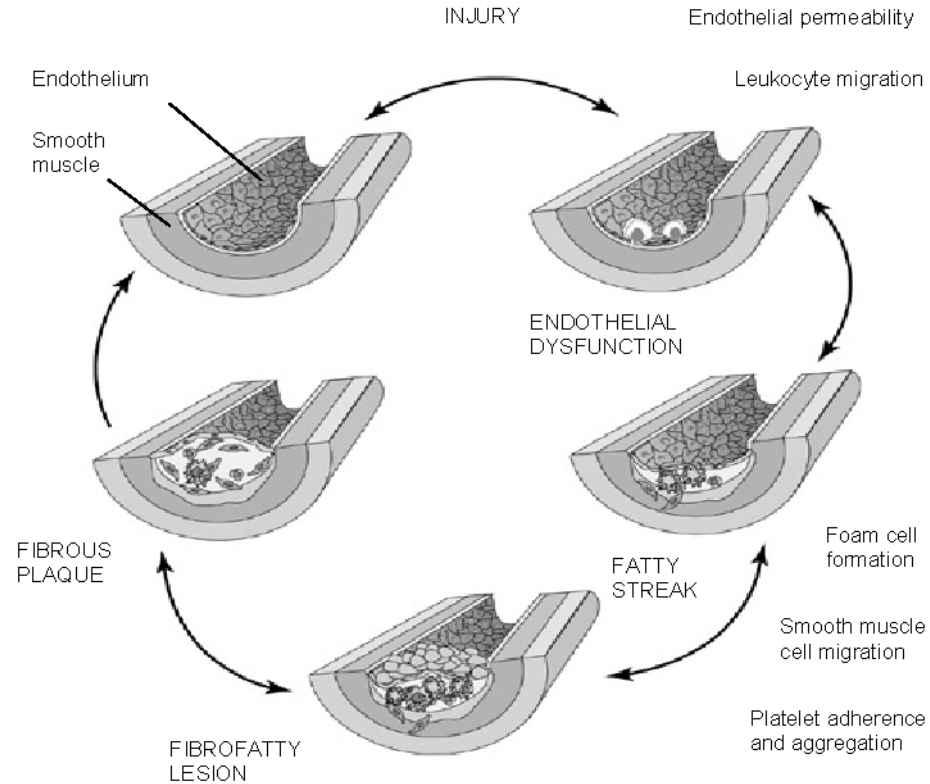


Figure 1. Stades du développement de l'athérosclérose (adapté de Ross R, 1999).

### I.1.2.1 La dysfonction endothéliale

L'endothélium vasculaire est constitué d'une mono-couche de cellules endothéliales qui agissent en tant que barrière dynamique maintenant l'homéostasie vasculaire. Le maintien du tonus, de la perméabilité vasculaire, de l'équilibre entre la production de facteurs pro-coagulants et anti-thrombotiques ainsi que le maintien et la formation de la matrice du tissu conjonctif sont assurés par la production par l'endothélium de nombreuses molécules effectrices telles que

l'oxyde nitrique (NO), l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (AngII), le facteur de von Willebrand (vWF), les cytokines et les molécules d'adhésion (Ross, 1999).

L'altération de la fonction endothéliale est la première étape de l'athérosclérose. Elle précède le développement de la lésion athéromateuse et contribue à son développement (Lusis, 2000). Elle se caractérise par une diminution de la biodisponibilité d'agents vasodilatateurs comme le NO et une augmentation de la production par l'endothélium de molécules vasoconstrictrices (Bonetti, Lerman, & Lerman, 2003). L'altération des capacités vasodilatatrices de l'endothélium qui s'en suit, représente le principal élément distinctif de cette étape. Elle est aussi caractérisée par un environnement pro-inflammatoire, pro-prolifératif et pro-coaguloire qui favorise toutes les étapes subséquentes du processus athérosclérotique. En effet, un endothélium activé favorise l'adhésion des monocytes à l'endothélium et leur migration vers l'espace sous-endothélial où ils deviennent des macrophages. Ces cellules, suite à leur captation de lipoprotéines de basse densité oxydées (LDLox), se transforment en cellules spumeuses qui contribuent au développement de la strie lipidique (Anderson, 1999).

L'activation endothéliale se traduit par la détérioration de la vasodilatation endothéliale en réponse à divers stimuli induisant le NO ainsi que par l'augmentation de l'expression de diverses molécules d'adhésion incluant la molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 (VCAM-1), la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la E-sélectine (ELAM-1) médiant l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium vasculaire (Ridker, Brown, Vaughan, Harrison, & Mehta, 2004; Rifai & Ridker, 2002). La dysfonction endothéliale



étant également caractérisée par une perte de l'activité antithrombotique et anticoagulante, plusieurs molécules favorisant une activité pro-thrombotique et pro-coagulante sont retrouvées à des niveaux plasmatiques élevés et sont des marqueurs d'un état de dysfonction endothéliale : le vWF, le facteur tissulaire (TF), la thrombomoduline soluble (sTM), l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA) et le plus important, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) (Vaughan, 2005; Meyer, Kundt, Steiner, Schuff-Werner, & Kienast, 2006; Mannucci, 1998). Plus récemment, la mesure du nombre et de la fonction des cellules endothéliales et des cellules endothéliales progénitrices circulantes, bien qu'elles ne soient pas encore utilisables en milieu clinique, ont été proposées comme nouveaux marqueurs de dysfonction endothéliale, étant toutes deux corrélées à d'autres marqueurs de dysfonction endothéliale in vivo et étant associées aux risques futurs d'accidents cardiovasculaires (Goon, Boos, & Lip, 2005; Werner & Nickenig, 2006).

Plusieurs études cliniques ont rapporté une association positive entre l'état de dysfonction endothéliale, tel que mesuré chez l'humain par la mesure de la vasodilatation endothélium-dépendante et des concentrations sériques de molécules d'adhésion solubles (sICAM-1, sVCAM-1) (Constans & Conri, 2006; Blann & Seigneur, 1997; Blankenberg, Barboux, & Tiret, 2003), 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 & Quinones, 2003). La dysfonction endothéliale constitue en elle-même un facteur de risque des MCV (Gonzalez & 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, Britten, & Zeiher, 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.1.2.2 Facteurs étiologiques de la dysfonction endothéliale**

Tel que mentionné plus haut, la dysfonction endothéliale est associée à diverses conditions pro-athérosclérotiques tels que l'hypertension artérielle, l'hyperhomocystéinémie, le diabète, l'hypercholestérolémie, le tabagisme et l'obésité (Ross, 1999).

Dans l'obésité et l'insulinorésistance (IR), plusieurs facteurs tels l'augmentation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la diminution de celle de l'adiponectine, une adipocytokine sécrétée par le tissu adipeux, l'augmentation des niveaux circulants d'acides gras libres (AGL) et l'hyperglycémie post-prandiale, contribuent à altérer l'expression génique et la signalisation dans l'endothélium vasculaire, induisent l'IR au niveau vasculaire et modifient la libération de facteurs dérivés de l'endothélium (Rask-Madsen & King, 2007).

Chez les patients insulino-résistants, on observe une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Ceci serait attribuable à une altération de la voie de signalisation PI-3K, diminuant la capacité de l'insuline

d'activer eNOS et de produire du NO (Montagnani, Ravichandran, Chen, Esposito, & Quon, 2002). Outre la PI-3K, d'autres molécules de la voie de signalisation de l'insuline, tels IRS-1, Akt et la kinase dépendante des phosphoinositides-1 (PDK-1), sont également impliqués dans la régulation d'eNOS et la production de NO (Kim et al., 2006). Notons par ailleurs que l'IR a la particularité d'altérer spécifiquement les voies de signalisation dépendantes de la PI-3K tandis que les autres voies de signalisation dépendantes de l'insuline, incluant la voie des MAPK, ne sont pas affectées (Jiang et al., 1999; Cusi et al., 2000). Qui plus est, l'hyperinsulinémie compensatrice qui accompagne l'IR peut suractiver la voie des MAPK (Jiang et al., 1999). Dans l'endothélium, une diminution de la signalisation de l'insuline via la voie de la PI-3K et une augmentation de la signalisation en réponse à l'insuline de celle des MAPK, peut mener à l'augmentation de l'expression de VCAM-1, de E-selectine et à la sécrétion accrue d'ET-1 (Kim et al., 2006), molécules jouant un rôle clé dans la dysfonction endothéliale.

Inversement, la dysfonction endothéliale peut contribuer de manière significative à l'IR. En effet, la dysfonction endothéliale étant caractérisée principalement par une diminution de la vasodilatation NO-dépendante de l'endothélium, celle-ci entraîne une diminution du flux sanguin qui, en réduisant la captation d'insuline et de glucose par le muscle squelettique, contribue à l'IR (Kearney, Duncan, Kahn, & Wheatcroft, 2008; Kim, Montagnani, Koh, & Quon, 2006). Les évidences les plus convaincantes de ce fait proviennent d'études effectuées chez l'humain ayant démontré une corrélation entre l'activation

endothéliale et l'IR chez des patients diabétiques de type 2 (Leinonen et al., 2003). Une association a également été démontrée entre la dysfonction endothéliale et l'IR chez des sujets ayant des antécédents familiaux de diabète de type 2, et ce, indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels (Balletshofer et al., 2000). Les fibrates sont des ligands des PPAR $\alpha$  qui améliorent le profil lipidique ainsi que la fonction endothéliale, tout en réduisant l'incidence d'accidents cardiovasculaires (Rubins et al., 1999; Keech et al., 2005). Or, Koh et coll. (Koh, Han, Quon, Yeal, & Shin, 2005a) ont récemment démontré que l'administration de fibrates pendant 2 mois à des patients hypertriglycéridémiques, augmente de façon significative, chez ceux-ci, la sensibilité à l'insuline et les niveaux plasmatiques d'adiponectine, sans modifier le poids. Ces résultats furent directement corrélés à l'amélioration de la fonction endothéliale (Koh et al., 2005a).

Par ailleurs, des essais cliniques avec certains médicaments utilisés pour le traitement de l'hypertension semblent également mettre en lumière le rôle de la dysfonction endothéliale dans l'IR. En effet, des inhibiteurs des enzymes de conversion de l'angiotensine (ACE) et des bloqueurs des récepteurs d'AngII, en diminuant les niveaux circulants d'AngII, diminuent non seulement la pression sanguine mais améliorent également la fonction endothéliale (Koh et al., 2004; Koh et al., 2005b). Or, les patients traités avec ces hypotenseurs présentent une amélioration significative de la fonction endothéliale et celle-ci est corrélée à une plus grande sensibilité à l'insuline (Koh et al., 2004; Koh et al., 2005b).

Ajoutons finalement que de récentes études cliniques ont démontré que l'utilisation d'ACE et de bloqueurs des récepteurs d'AngII, chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires, diminue le risque de développer un diabète de type 2 tandis que l'utilisation d'ACE chez des patients diabétiques de type 2, diminue l'incidence d'événements cardiovasculaires (Yusuf et al., 2005; Yusuf et al., 2001). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que les interventions thérapeutiques à l'aide de médicaments améliorant la fonction endothéliale, entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline et supportent le rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'IR ainsi que la relation de réciprocité qui les unit.

Les facteurs contribuant à la dysfonction endothéliale dans le diabète sont : les facteurs métaboliques, incluant l'hyperglycémie, un excès d'AGL et la formation des produits terminaux de glycation (AGE), le stress oxydatif, l'IR et l'inflammation (King, 1996). Il est intéressant de remarquer que les mêmes facteurs responsables de la dysfonction endothéliale contribuent également à l'IR, tel qu'illustré à la Figure 2. Ainsi en est-il de l'hyperglycémie qui, via l'activation des voies des pentoses ou polyols, la formation des AGE, l'activation de la PKC et la genèse de stress oxydatif, induit un état de glucotoxicité entraînant l'IR et la dysfonction endothéliale. Parallèlement, l'augmentation des niveaux circulants d'AGL que l'on observe dans le diabète, l'obésité et les dyslipidémies, entraîne une lipotoxicité causant elle aussi l'IR et la dysfonction endothéliale. Finalement, l'inflammation induisant également l'IR et la dysfonction endothéliale, ceci souligne

encore une fois la relation de réciprocité qui existe entre l'IR et la dysfonction endothéliale.

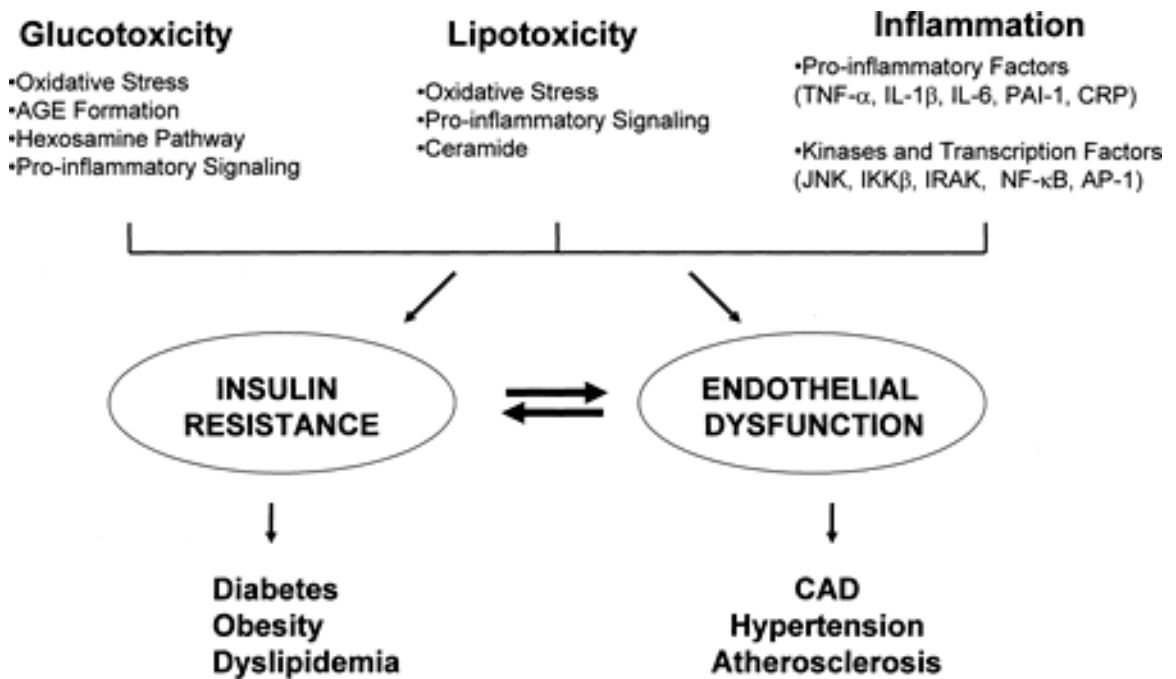


Figure 2. Mécanismes partagés par l'IR et la dysfonction endothéliale mettant en lumière leur réciprocité (Kim J, 2006).

De manière plus détaillée, l'hyperglycémie provoque une élévation des niveaux d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) médiée par l'activation de la nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) et/ou de la protéine kinase C (PKC) (King, 1996). L'activation de cette dernière module l'expression génique de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), de l'ET-1, du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), du facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ), du PAI-1 et active le facteur nucléaire-kappa B (NF-kB), un facteur de transcription sensible au stress oxydatif qui augmente l'expression génique de molécules pro-inflammatoires (Brownlee, 2005). Ces ROS inactivent le NO en formant du peroxy-nitrite qui diminue la biodisponibilité du NO et conséquemment, altère la vasodilatation de l'endothélium (Beckman, 2001; Nishikawa et al., 2000). L'hyperglycémie a également pour effet d'induire l'apoptose des cellules endothéliales et de diminuer leur prolifération, d'accroître l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et ELAM-1, d'augmenter la production d'IL-6, d'augmenter l'expression de matrice extracellulaire et de protéines pro-coagulantes et d'inhiber la fibrinolyse (Brownlee, 2005).

Parallèlement, la glucotoxicité peut causer l'IR, comme mentionné plus tôt, via l'activation des voies des pentoses ou polyols, la formation des AGE, l'activation de la PKC et la genèse de stress oxydatif. La glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) est l'enzyme limitante dans la voies des pentoses ou polyols et la surexpression de cette enzyme chez la souris, entraîne

l'IR (Veerababu et al., 2000). La GFAT causerait des modifications sur des sites de phosphorylation en serine/threonine sur des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline (Rossetti, 2000).

L'augmentation de la formation de AGE, associée à la glucotoxicité, peut inhiber tant les effets métaboliques que vasculaires de l'insuline (Kim et al., 2006). Les AGE inhibe la phosphorylation en tyrosine induite par l'insuline du récepteur du substrat de l'insuline-1 (IRS-1), altérant ainsi l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) et de la protéine kinase B (Akt), protéines jouant un rôle clé dans la signalisation de l'insuline (Miele et al., 2003).

Finalement, l'activation de la PKC et le stress oxydatif induits par la glucotoxicité peuvent également contribuer à l'IR. En effet, l'augmentation de stress oxydatif entraîne l'activation de kinases serine/threonine et l'activation des facteurs de transcription NF-kB et AP-1, menant à l'IR (Kim, Montagnani, Koh, & Quon, 2006). Plus précisément, l'activation de ces kinases serine/threonine et de la PKC induisent la phosphorylation en serine d'IRS-1, altérant sa capacité à activer la PI-3K et diminuant l'activation en aval d'Akt, entraînant ultimement une diminution de la translocation du transporteur de glucose, GLUT4, contribuant à l'IR (Kim, Montagnani, Koh, & Quon, 2006).

Les AGL, quant à eux, influencent la vasodilatation dépendante de l'endothélium en réduisant les niveaux plasmatiques de plusieurs acides aminés, incluant la L-arginine, le substrat d'eNOS (Ferrannini et al., 1986). Une inhibition directe d'eNOS par les AGL a également été rapportée (Davda et al., 1995). Les



AGL augmentent de plus la production de ROS (Tripathy et al., 2003) et de peroxy-nitrites (O'Donnell & Freeman, 2001), activent des voies de signalisation pro-inflammatoires (Itani, Ruderman, Schmieder, & Boden, 2002) et, via les céramides, diminuent la biodisponibilité du NO (Li et al., 2002b). De manière similaire, les AGE interfèrent avec l'enzyme eNOS (Vlassara & 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, Desfaits, & Serri, 2000).

La lipotoxicité peut également engendrer l'IR. En effet, de récentes études ont démontré qu'un excès d'AGL peut causer une dysfonction mitochondriale qui inhibe directement le transport du glucose (Petersen et al., 2003). De plus, des dérivés du métabolisme des AGL, tel le diacylglycerol, peuvent stimuler l'expression de certains isoformes de la PKC, telle la PKC $\theta$ , qui favorisent l'IR (Lowell et al., 2005). Par ailleurs, l'augmentation de stress oxydatif associée à la lipotoxicité augmente l'expression d'adipokines, tels l'adiponectine et la protéine chémoattractive monocytaire-1 (MCP-1) qui peuvent altérer le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique (Kim et al., 2006). Ajoutons qu'en augmentant le stress oxydatif via notamment la génération de ROS, un excès d'AGL peut activer NF- $\kappa$ B, stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires, tel le TNF $\alpha$ , qui en phosphorylant les résidus serine de IRS-1/2, mènent à l'IR (Hirosumi et al., 2002). Finalement, les céramides, des produits dérivés du métabolisme des

AGL, inhibent l'activation induite par l'insuline d'Akt ainsi que la translocation de GLUT4 (Chavez et al., 2003).

Le diabète, l'obésité et plusieurs autres maladies chroniques sont associées à un état inflammatoire caractérisé par une augmentation des concentrations sériques de marqueurs de l'inflammation et une infiltration macrophagique du tissu adipeux (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). En effet, les facteurs métaboliques dysrégulés dans ces pathologies tels le glucose, les AGL et les AGE, augmentent les niveaux de stress oxydatif qui en activant les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B, modulent la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , et le TNF $\alpha$  (Kim et al., 2006) et induisent donc l'inflammation.

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont démontré que l'inflammation joue un rôle clé dans la dysfonction endothéliale et que ces deux entités sont inter-reliées (Fichtlscherer et al., 2000; Huang & Vita, 2006; Kim, Gallis, & Corson, 2001a; Verma, Buchanan, & Anderson, 2003). En effet, la diminution de la biodisponibilité du NO qui caractérise la dysfonction endothéliale, se traduit en un état inflammatoire parce que le NO possède des propriétés anti-inflammatoires et inhibe l'activité du NF- $\kappa$ B (Peng, Libby, & Liao, 1995). De plus, en exprimant différentes molécules d'adhésion dont VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine permettant l'adhésion des monocytes à l'endothélium et leur migration sous la paroi vasculaire (Calles-Escandon & Cipolla, 2001), l'endothélium joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. Inversement, plusieurs cytokines inflammatoires et la

protéine C-réactive (CRP), un marqueur inflammatoire, en diminuant l'expression de eNOS et augmentant celle de diverses molécules d'adhésion et vasoconstrictrices, peuvent induire la dysfonction endothéliale et une association entre la dysfonction endothéliale et la CRP est bien documentée chez l'humain (Yudkin, Stehouwer, Emeis, & Coppack, 1999; Verma et al., 2003). Ceci indique qu'il existe bel et bien un lien entre la dysfonction endothéliale et l'inflammation.

Par ailleurs, dans le diabète et l'obésité, la signalisation de l'insuline étant altérée, cette hormone ne peut exercer ses actions anti-inflammatoires, actions médiées via la diminution, entre autres, de l'expression d'ICAM-1, de NF- $\kappa$ B et de MCP-1 (Aljada, Saadeh, Assian, Ghanim, & Dandona, 2000; Aljada, Ghanim, Saadeh, & Dandona, 2001). En accord avec ces dernières données, des études in vivo et in vitro démontrent que l'administration de sensibilisateurs à l'insuline, tel les thiazolidinediones (TZDs), exercent de profonds effets anti-inflammatoires en diminuant l'expression de diverses molécules impliquées dans l'inflammation dont le TNF $\alpha$ , l'ICAM-1, le NF- $\kappa$ B, le MCP-1 et la CRP et en augmentant l'expression d'IL-10, une cytokine ayant des propriétés anti-inflammatoires (Dandona et al., 2002). Plusieurs molécules pro-inflammatoires augmentées dans ces pathologies, tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ), peuvent induire l'IR (Teruel, Hernandez, Rial, Martin-Hidalgo, & Lorenzo, 2005). Le TNF $\alpha$ , l'interleukine-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et l'interleukine-6 (IL-6) peuvent de plus activer les suppresseurs de signalisation de l'insuline (SOCS) qui interfèrent avec la liaison de l'IRS-1 au récepteur de l'insuline et augmente la dégradation de IRS-1 (Emanuelli et al.,

2001). L'inflammation peut donc contribuer à l'IR en modulant les voies de signalisation de l'insuline et sa transcription.

À la lumière de l'ensemble des évidences présentées ci-haut, il est clair que les mêmes mécanismes qui engendrent l'IR, soit la glucotoxicité, la lipotoxicité et l'inflammation, sont également impliqués dans la genèse de la dysfonction endothéliale et renforcent donc la relation de réciprocity entre ces deux pathologies. Notons de plus que la voie de signalisation de l'insuline qui implique le récepteur à insuline, IRS-1, la PI-3K, Akt et qui module la translocation de GLUT4 et la captation de glucose par le muscle et le tissu adipeux est la même voie de signalisation régissant, dans l'endothélium, l'activation d'eNOS et la production de NO (Kim et al., 2006). Donc dans des conditions pathologiques, une altération parallèle des voies de signalisation de l'insuline contribue au couplage synergique de l'IR et de la dysfonction endothéliale.

#### **I.1.2.2.1 Acides gras**

Les acides gras étant au cœur de notre deuxième article, nous approfondirons leurs effets sur la fonction endothéliale dans les prochaines sections.

Les niveaux plasmatiques d'AGL sont augmentés chez les individus obèses et souffrant de diabète de type 2. Cette augmentation d'AGL peut non seulement causer l'IR, comme mentionné précédemment, mais diminue également la biodisponibilité et la production endothéliale de NO (Boden, 2005; Wang et al.,

2006). Les acides gras varient quant à leur potentiel d'affecter la fonction de l'endothélium. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les acides gras  $\omega 3$  (eicosapentaénoïque [EPA], 20:5  $\omega 3$  et docosahexaénoïque [DHA], 22:6  $\omega 3$ ) diminuent l'adhésion des monocytes à l'endothélium et réduisent significativement l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1 (Collie-Duguid & Wahle, 1996; De, Liao, & Libby, 2000). L'acide oléique (OA, 18:1), un acide gras monoinsaturé, aurait lui aussi des effets bénéfiques en inhibant l'activation de l'endothélium (Carluccio et al., 1999; Massaro & De, 2002). Les acides gras saturés, quant à eux, sont inertes quant à leur capacité d'affecter l'endothélium (Dichtl et al., 2002) tandis que les acides gras trans sont pro-inflammatoires et induisent la dysfonction endothéliale (Mozaffarian, 2006). De tous les acides gras, l'acide linoléique (LA, 18:2  $\omega 6$ ) est celui qui présente les effets les plus importants et les plus délétères au niveau de l'endothélium vasculaire.

#### **I.1.2.2.1.1 Effets pro-inflammatoires de LA**

Il a été démontré que le LA possède la capacité de stimuler une réponse inflammatoire dans les cellules endothéliales en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules d'adhésion (Hennig, Toborek, & McClain, 2001). En effet, LA augmente significativement dans les cellules endothéliales les niveaux d'ARNm du  $TNF\alpha$ , MCP-1, VCAM-1 et ICAM-1 et active les facteurs de transcription NF-kB et AP-1 (Toborek, Lee, Garrido, Kaiser,

& Hennig, 2002) qui jouent un rôle clé dans la régulation des gènes liés à l'inflammation.

Les effets pro-inflammatoires de LA sur l'endothélium seraient médiés via l'activation des voies de signalisation PI-3K/protéine kinase B (Akt), kinases extracellulaires régulées 1/2 (ERK 1/2) et protéine kinase mitogénique activée p38 (p38 MAPK) (Hennig et al., 2006). Young et coll. (Young, Toborek, Yang, McClain, & Hennig, 1998) ont également démontré que LA augmente la production d'interleukine-8 (IL-8) et l'expression d'ICAM-1 et que LA peut amplifier l'effet du  $TNF\alpha$  sur la production de ces molécules pro-inflammatoires. Une amplification de l'effet du  $TNF\alpha$  sur la production d'IL-6 a également été observée dans des cellules endothéliales pré-incubées avec LA avant d'être exposées au  $TNF\alpha$  (Hennig, Meerarani, Ramadass, Watkins, & Toborek, 2000). Outre LA, ses dérivés oxydés, l'acide hydroperoxyoctadécadiénoïque (HOPDE) et l'acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE), peuvent aussi induire d'importantes réponses pro-inflammatoires (Friedrichs et al., 1999; Slim et al., 2001).

#### **I.1.2.2.1.2 Rôle de LA dans l'activation et la dysfonction endothéliale**

Une vaste littérature existe sur les effets néfastes de LA sur l'endothélium vasculaire et de nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer ses effets délétères. Ceux-ci incluent l'altération de l'intégrité cellulaire de l'endothélium et de la fonction des protéines de type gap (Jiang, Bryce, Horrobin, & Mansel, 1998), l'altération de la morphologie cellulaire (Denning, Figard, Kaduce, & Spector, 1983),

des enzymes liés à la membrane (Ramasamy, Boissonneault, Decker, & Hennig, 1991), des peroxysomes (Hennig et al., 1990) et l'induction de la mort cellulaire programmée (Toborek, Blanc, Kaiser, Mattson, & Hennig, 1997). Néanmoins, plusieurs études s'entendent pour reconnaître l'augmentation intracellulaire des niveaux de stress oxydatif et de calcium, comme étant le principal mécanisme responsable des effets néfastes de LA sur la fonction endothéliale (Hennig et al., 1996; Toborek et al., 1997; Toborek et al., 2002) tel qu'illustré à la Figure 3. En effet, il a été démontré qu'une diète enrichie en LA augmente, in vivo, les niveaux de stress oxydatif et affecte le métabolisme du NO (Turpeinen, Basu, & Mutanen, 1998). Des résultats similaires ont été observés in vitro dans des cellules endothéliales (Toborek et al., 1997). Saraswathi et coll. ont observé que LA génère des anions superoxydes via l'enzyme CYP2C9 dans les cellules endothéliales (Viswanathan et al., 2003) et qu'il augmentait la formation de peroxy-nitrites, entraînant dès lors une augmentation du stress oxydatif dans ces cellules (Saraswathi, Wu, Toborek, & Hennig, 2004). Il a également été observé que LA diminuait les niveaux de glutathion (Hennig et al., 2000), un tripeptide et puissant antioxydant, et augmentait l'expression du facteur de transcription sensible au stress, NF- $\kappa$ B (Hennig et al., 1996; Toborek et al., 1996). Finalement, LA augmente la déformation des monocytes et leur adhésion à l'endothélium (Rinker et al., 2004) et induit l'expression d'ET-1 dans les cellules endothéliales aortiques humaines (HAECs) (Park et al., 2003).

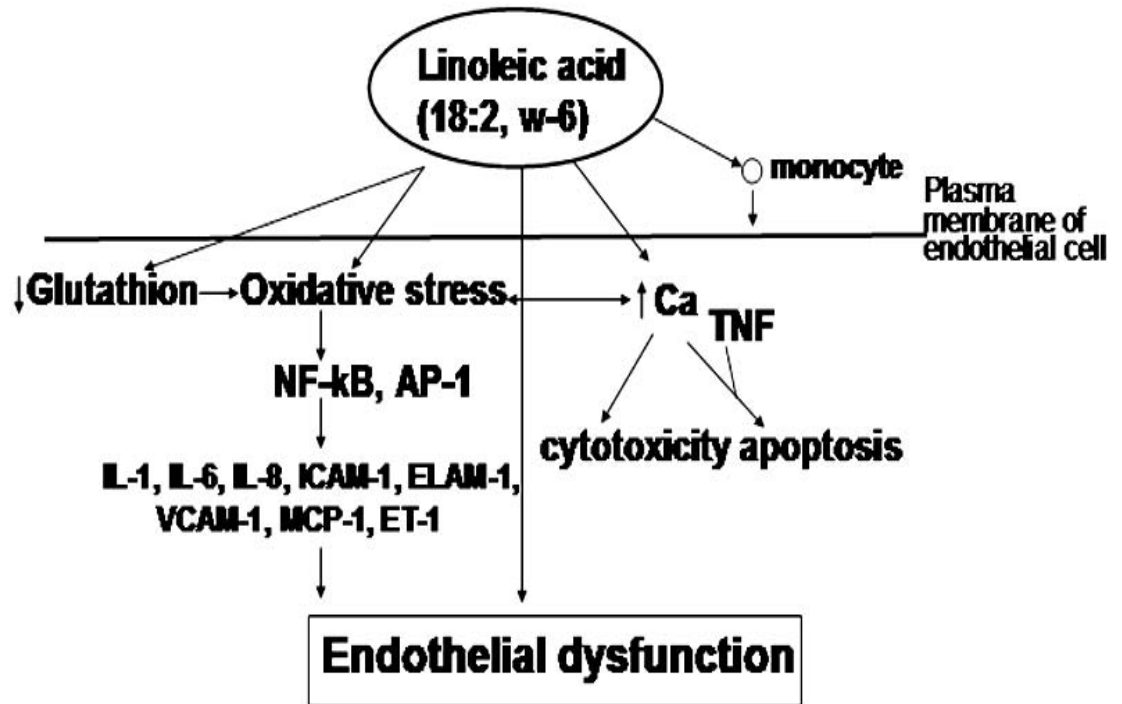


Figure 3. Rôle de LA dans la dysfonction endothéliale (adapté de Toborek M, 1998).



### **I.1.2.2.1.3 Rôle de LA dans l'athérosclérose**

De nombreuses études suggèrent que LA jouerait un rôle clé dans l'athérosclérose. Il a premièrement été démontré que les niveaux de LA dans le tissu adipeux sont corrélés au degré de maladie coronarienne (Hodgson, Wahlqvist, Boxall, & Balazs, 1993) et à l'incidence d'apparition de nouvelles lésions athérosclérotiques dans les artères coronariennes (Blankenhorn, Johnson, Mack, el Zein, & Vailas, 1990). Deuxièmement, des concentrations élevées de LA ont été documentées dans les fractions phospholipidiques d'artères coronaires humaines dans les cas de mort cardiaque subite et de maladie cardiaque ischémique (Luostarinen, Boberg, & Saldeen, 1993). Finalement, une étude effectuée dans une population israélienne, possédant l'un des plus haut ratio de gras alimentaire polyinsaturé/saturé, en est venue à la conclusion qu'une diète riche en acide gras  $\omega 6$  pourrait contribuer à une incidence accrue d'athérosclérose (Yam, Eliraz, & Berry, 1996).

### **I.1.2.3 La strie lipidique**

La strie lipidique est une lésion déjà observable chez 65% des enfants âgés de 12 à 14 ans (Worthley, Osende, Helft, Badimon, & Fuster, 2001). Elle est caractérisée par la présence de cellules inflammatoires, principalement des cellules spumeuses et des lymphocytes T et de CML qui migrent vers l'espace sous-endothélial 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 le MCP-1, semblent responsables de l'attraction et de l'accumulation des macrophages et des lymphocytes dans la paroi vasculaire.

Les LDL s'accumulent dans la paroi vasculaire et y subissent des modifications telles que l'oxydation, la glycation et l'agrégation. Ces LDL modifiées constituent une cause majeure de dommage à l'endothélium ou aux CML (Ross, 1999). En effet, elles sont captées rapidement par les macrophages via des récepteurs "scavenger" tels que le récepteur scavenger-A (SR-A) et le CD36. Ces récepteurs ne subissant pas de régulation négative par l'accumulation de LDL modifiées dans la cellule, ces particules accentuent la formation de cellules spumeuses (Itabe, 2003) et leur nécrose (Schwartz, Valente, Sprague, Kelley, & Nerem, 1991), et contribuent à la formation d'une masse croissante de lipides extracellulaires et d'autres débris cellulaires. Les LDL modifiées, en plus de maintenir un milieu pro-inflammatoire en favorisant la sécrétion de cytokines par les cellules spumeuses, 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 (Worthley et al., 2001), et celle du MCP-1 par les cellules endothéliales (Ross, 1999). Ces deux cytokines ainsi que les LDLox favorisent l'accumulation des macrophages dans l'espace sous-endothélial. Finalement, les LDLox contribuent à amplifier la réponse inflammatoire en agissant comme agents chimotactiques 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.1.2.4 La lésion avancée ou compliquée**

La plaque fibreuse se caractérise par la formation d'une coiffe fibreuse composée de macrophages, de CML, de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycans recouvrant le core lipidique (Lusis, 2000). Une multitude de phénomènes pathogéniques tels que l'accumulation de lipides extracellulaires, la formation de cellules spumeuses et leur apoptose, la réduction de la matrice extracellulaire et des CML, l'inflammation chronique et la revascularisation, sont à l'origine de la lésion avancée (Stary, 2000). Les CML et la matrice extracellulaire normalement présentes dans la partie profonde de l'intima cèdent leur place à des gouttelettes lipidiques. Des particules de calcium sont aussi observées dans les noyaux de ces lésions (Stary et al., 1995). Cette calcification de la paroi artérielle étant intimement liée à l'athérosclérose, elle est considérée comme un marqueur de la présence de la maladie. En effet, Arad et coll. (Arad, Spadaro, Goodman, Newstein, & Guerci, 2000) ont démontré qu'une augmentation de la quantité de calcium dans les artères coronaires est associée à une incidence accrue de lésions obstructives et de futurs accidents cardiovasculaires.

Par l'entremise d'un processus appelé remodelage vasculaire (Glagov, Zarins, Giddens, & Ku, 1988), l'élargissement du vaisseau compense pour le développement de la plaque à l'intérieur de celui-ci mais éventuellement,

l'accroissement de la plaque et le rétrécissement progressif de la lumière vasculaire limite 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 plaque et la formation d'un thrombus peuvent se produire.

#### **I.1.2.5 La plaque fibreuse instable**

Des études ont démontré que le développement d'accidents cardiovasculaires suite à la rupture de la plaque dépend principalement de la composition et de la vulnérabilité de la plaque plutôt que de l'importance et de la sévérité de la sténose (Lusis, 2000). Une érosion ou un amincissement de la coiffe fibreuse est considéré comme un signe précurseur de rupture de la plaque et de sa vulnérabilité. 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). La dégradation de la matrice par diverses protéinases et mastocytes et l'inhibition de la sécrétion de la matrice, engendrent des plaques fibreuses très minces et plus vulnérables. La perte de collagène peut également amincir la plaque. Cette perte peut être attribuée à l'effet inhibiteur de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produit par les lymphocytes T sur l'expression de collagène par les CML et l'effet apoptotique de cette cytokine sur ces cellules (Libby, 1995). L'instabilité de la plaque peut être modulée par

l'infection et par la réponse immunitaire locale et en particulier par la production de métalloprotéinases par les macrophages (Thompson, Kienast, Pyke, Haverkate, & van de Loo, 1995). La stabilité de la plaque peut également être influencée par la calcification et la néovascularisation, deux caractéristiques communes des lésions avancées (Shah, 2003). La formation d'un thrombus, constitué de plaquettes adhérentes et de fibrine est généralement due à la rupture de la plaque, exposant à la circulation sanguine le TF, une enzyme clé de la cascade de coagulation, présente dans le core lipidique. La rupture se produit fréquemment aux extrémités de la lésion, riches en cellules spumeuses, ce qui suggère que des facteurs contribuant à l'inflammation pourraient également influencer la thrombose (Richardson, Davies, & Born, 1989).

### **I.1.3 Facteurs de risque traditionnels des MCV**

#### **I.1.3.1 Diabète**

Les patients souffrant de diabète ont un risque accru de développer des MCV (Resnick & Howard, 2002). Plusieurs facteurs de risque associés au diabète de type 2 tels que, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'obésité et l'hyperinsulinémie peuvent expliquer ce risque accru. La pathogénèse des MCV associées au diabète de type 2 est discutée à la section I.2.7.

### **I.1.3.2 Dyslipidémie**

L'augmentation des taux de cholestérol sanguin et de lipoprotéines athérogéniques représente un important facteur de risque des MCV. Tout particulièrement, l'augmentation des LDL plasmatiques représente un facteur de risque majeur des maladies coronariennes et leur accumulation dans l'espace sous-endothélial est l'élément déclencheur du processus athérosclérotique. À noter que les LDL captives dans la paroi vasculaire subissent de nombreuses modifications tels que l'oxydation, la lipolyse, la glycation, la protéolyse et l'agrégation; modifications qui augmentent considérablement leur potentiel athérogénique (Han, Hajjar, Febbraio, & Nicholson, 1997; Khoo, Miller, McLoughlin, & Steinberg, 1988; Navab et al., 1996; Steinberg, 1997). En effet, les LDL modifiées stimulent divers processus athérogéniques tels la formation de cellules spumeuses, la relâche de cytokines, la différenciation des monocytes en macrophages, l'adhésion des monocytes à l'endothélium, l'augmentation de la perméabilité endothéliale et l'expression de PAI-1 (Dichtl et al., 1999; Gardner, Banka, Roberts, Mullick, & Rutledge, 1999). Une faible concentration de HDL sériques constitue également un important facteur de risque de MCV. En effet, les HDL ont un effet athéroprotecteur grâce à leurs propriétés antioxydantes, principalement attribuables à la paraoxonase 1 (PON1), une estérase pouvant dégrader certains phospholipides oxydés (Shih et al., 2000). Ajoutons que l'hypertriglycéridémie a été identifiée comme un facteur de risque indépendant de MCV (Austin, 1998) et qu'il a récemment été démontré que l'hypertriglycéridémie post-prandiale peut causer la dysfonction endothéliale en augmentant le stress

oxydatif via l'augmentation de la production d'anions superoxydes et l'inactivation du NO (Bae et al., 2001).

### **I.1.3.3 Hypertension**

L'hypertension artérielle représente un facteur de risque majeur de MCV et son incidence augmente avec l'âge et le sexe (Staessen, Amery, & Fagard, 1990). Elle est la plupart du temps accompagnée d'autres facteurs de risque comme le diabète et l'obésité. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont démontré les effets bénéfiques d'une réduction de la pression sanguine sur les MCV (Assmann, Cullen, Jossa, Lewis, & Mancini, 1999; Luft et al., 1988). L'hypertension artérielle pourrait favoriser l'athérosclérose par ses effets sur le stress oxydatif, la dysfonction endothéliale et la production accrue de cytokines pro-inflammatoires (Reaven, Lithell, & Landsberg, 1996).

### **I.1.3.4 Tabagisme**

Il a été établi que les fumeurs, indépendamment de leur sexe, présentent un risque accru de MCV et de mortalité par MCV comparativement aux non-fumeurs (Burns, 2003; Hennekens, 1997). Le tabagisme augmente aussi le risque de MCV associées à d'autres facteurs de risque tels que le diabète et l'hypertension. Les modes d'action proposés pour expliquer cet effet sont, entre autres, la diminution des niveaux plasmatiques d'antioxydants, la production de radicaux libres et l'induction de la dysfonction endothéliale (Lehr, 2000).

### **I.1.3.5 Âge, sexe et origine ethnique**

Le risque de développer des MCV augmente avec l'âge (Wick, Berger, Jansen-Durr, & Grubeck-Loebenstein, 2003). Cette augmentation de risque peut être attribuable notamment à l'accumulation de radicaux libres dans la circulation sanguine (Ferrucci et al., 2002). Chez les hommes de moins de 60 ans, le risque de développer des MCV est plus de deux fois supérieur à celui observé chez une femme de même âge. Mais une fois la ménopause atteinte, les risques chez celles-ci augmentent et peuvent même dépasser ceux des hommes (Goldschmid et al., 1994). Ceci est attribuable à la diminution dramatique des oestrogènes circulants, ayant pour conséquence une redistribution de l'adiposité au niveau abdominal et un changement dans le profil lipidique favorisant une diminution des HDL et une augmentation de LDL et de triglycérides (TG) plasmatiques (Milewicz, Tworowska, & Demissie, 2001).

Pour ce qui est de l'origine ethnique, des études ont montré de façon consistante, une plus grande incidence de MCV chez les femmes de race noire, mais non chez les hommes de race noire, comparativement aux blancs (Gillum, 1997; Jones et al., 2002). Quant aux indiens d'Amérique, le "*Strong Heart Study*" a observé chez un groupe de 4549 de ces individus, une incidence de MCV près du double de celle observée chez les noirs américains et 4 fois plus élevée que celle observée chez les blancs (Howard et al., 1999; Jones et al., 2002).



### **I.1.3.6 Obésité**

De nombreuses études s'entendent pour reconnaître que l'obésité, et particulièrement l'obésité abdominale, constitue un facteur de risque majeur des MCV (Lemieux et al., 2002; Rexrode, Buring, & Manson, 2001). L'obésité constitue un facteur prédictif indépendant des maladies coronariennes athérosclérotiques (Manson et al., 1995). Toutefois, l'obésité abdominale est associée à un ensemble de perturbations métaboliques, le syndrome métabolique, ayant comme caractéristique principale, la résistance à l'insuline et ce syndrome est fortement associé à un risque accru de MCV (Grundy, 2004). De plus, le tissu adipeux est maintenant reconnu comme étant bien plus qu'un simple entrepôt de cellules adipeuses, représentant plutôt un tissu métaboliquement actif jouant un rôle prépondérant dans l'inflammation. Plusieurs des molécules sécrétées par le tissu adipeux jouent un rôle dans divers processus liés de loin ou de près à l'athérosclérose. Celles-ci seront étudiées plus en détail dans la section sur le diabète de type 2.

### **I.1.4 Facteurs de risque non traditionnels**

#### **I.1.4.1 Lp(a)**

La lipoprotéine (a) ou Lp(a) est une lipoprotéine dont la structure est similaire aux LDL, la seule différence étant l'ajout d'une apolipoprotéine (a) (apo (a)) liée via un pont disulfure à une apolipoprotéine B-100. Contrairement aux autres lipoprotéines comme les HDL et LDL, les taux de Lp(a) sanguins sont peu

influencés par la diète ou l'exercice (Gaw, Boerwinkle, Cohen, & Hobbs, 1994). Les concentrations de Lp(a) sont en grande partie sous contrôle génétique et varient de façon substantielle entre individus en fonction de la taille de l'isoforme apo (a) présent. Sa fonction biologique n'est pas très claire mais de fortes évidences suggèrent qu'elle jouerait un rôle dans la réponse aux injures tissulaires et aux lésions vasculaires, dans la protection contre l'envahissement par des pathogènes infectieux et dans la cicatrisation.

Son rôle le plus important dans l'athéromatose serait d'inhiber la fibrinolyse du caillot au site d'injure tissulaire, d'induire la production de PAI-1 et d'inhiber la sécrétion de t-PA par les cellules endothéliales (Anuurad, Boffa, Koschinsky, & Berglund, 2006; Shah, 2003). De nombreuses études épidémiologiques soutiennent le rôle de la Lp(a) dans l'athéromatose. Une récente méta-analyse de 27 études prospectives avec un suivi moyen de 10 ans, a démontré un risque combiné de 1.6 (95% IC, 1.4-1.8) pour les individus ayant une concentration en Lp(a) se situant dans le premier tertile comparativement aux individus dont les concentrations en Lp(a) se situent dans le dernier tertile (Danesh, Collins, & Peto, 2000), une association ne diminuant pas après ajustement pour les facteurs de risque traditionnels. Des taux élevés de Lp(a) pourraient être particulièrement délétères en présence de taux élevés de LDL, de faibles concentrations en HDL, de diabète, d'hypertension, d'hyperhomocystéinémie et de concentrations élevées en fibrinogène (Cantin et al., 2002; Foody et al., 2000; Solfrizzi et al., 2002; von, Schulte, Cullen, & Assmann, 2001)

#### **I.1.4.2 Fibrinogène**

Le fibrinogène est une glycoprotéine circulante qui agit dans la dernière étape de la réponse coagulatoire. Son clivage par la thrombine produit de petits fragments solubles qui constituent les composés les plus abondants des caillots sanguins. Outre son rôle dans la coagulation, le fibrinogène régule divers autres processus tels l'adhésion tissulaire, le chémotactisme et la prolifération (Fuster, Badimon, Badimon, & Chesebro, 1992), la vasoconstriction aux sites de lésions vasculaires (Herrick, Blanc-Brude, Gray, & Laurent, 1999), l'agrégation plaquettaire (Danesh, Collins, Appleby, & Peto, 1998) et il est également un déterminant de la viscosité sanguine (Letcher, Chien, Pickering, Sealey, & Laragh, 1981). Des données épidémiologiques démontrent une association indépendante entre des taux élevés de fibrinogène et les risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. Dans deux récentes méta-analyses portant sur 18 et 22 études prospectives, on a observé des ratios de risque très élevés chez les individus dont les concentrations en fibrinogène se situaient dans le premier tertile comparativement aux individus dont les concentrations en fibrinogène se situaient dans le dernier tertile (ratio de risque, 1.8; 95% IC 1.6-2.0 et 1.99; 95% IC, 1.85-2.13) respectivement (Danesh et al., 1998; Maresca, Di, Marchioli, & Di, 1999). D'autres études ont démontré de fortes associations entre les taux de fibrinogène, les maladies vasculaires périphériques (Fowkes, 1995; Lee, Fowkes, Lowe, Connor, & Rumley, 1999) et les accidents vasculaires ischémiques (Folsom et al., 1999; Tanne et al., 2001).

### I.1.4.3 Homocystéine

L'homocystéine (Hcys) est un acide aminé contenant un groupement sulfure, dérivé du métabolisme de la méthionine. Il existe 3 types de désordres génétiques du métabolisme de l'Hcys, appelés homocystinurie homozygote. Les individus qui en sont atteints présentent des taux élevés d'Hcys sanguins et urinaires et la moitié d'entre eux, développent une thrombose artérielle ou veineuse avant l'âge de 30 ans (De, Verschuren, Kromhout, Kluijtmans, & Blom, 2002). De nombreuses études ont rapporté une association entre les concentrations en Hcys et les risques de MCV tant dans la population générale que chez des individus ayant des antécédents de MCV. Généralement, les études prospectives démontrent une plus faible association entre les concentrations plasmatiques en Hcys et les risques de MCV, que les études rétrospectives cas-contrôle. Cependant, des méta-analyses d'études prospectives, corrigeant pour la variabilité intra-individuelle des taux d'Hcys au cours du suivi, démontrent une association significative entre les concentrations plasmatiques en Hcys et les risques de MCV (2002; Bautista, Arenas, Penuela, & Martinez, 2002; Wald, Law, & Morris, 2002). Par contre, de récentes études d'intervention où l'on administrait à des individus de l'acide folique et les vitamines B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>, des vitamines diminuant les concentrations plasmatiques de Hcys, n'ont pas observé de réduction de risques de MCV chez des patients ayant de tels antécédents (Bonna et al., 2006; Lonn et al., 2006).

Des études ont démontré que l'Hcys pourrait induire des dommages vasculaires en induisant l'activation plaquettaire, le stress oxydatif, la dysfonction endothéliale, l'hypercoagulabilité, la prolifération des CML et le stress au niveau du

réticulum endoplasmique (RE) (De et al., 2002; Mangoni & Jackson, 2002; Werstuck et al., 2001).

#### **I.1.4.4 Protéine C-réactive**

La protéine C-réactive (CRP) est une protéine membre de la famille des pentraxines. C'est une molécule de reconnaissance de modèles calcium-dépendante, composée de 5 sous-unités arrangées selon une forme pentamérique (Shrive et al., 1996). La CRP est une protéine de la phase aiguë, faisant partie de la réponse immunitaire innée, dont la concentration peut être augmentée jusqu'à 1000 fois au cours de la réponse inflammatoire, suite à une lésion tissulaire ou une infection (Pepys & Baltz, 1983). Bien que la CRP soit produite principalement par le foie en réponse à la sécrétion d'IL-6, elle est aussi présente dans l'endothélium des plaques athérosclérotiques, les macrophages, les CML et les adipocytes (Calabro, Willerson, & Yeh, 2003; Lau, Dhillon, Yan, Szmitko, & Verma, 2005; Yasojima, Schwab, McGeer, & McGeer, 2001). Comme les concentrations de CRP redescendent aussi vite qu'elles ne montent suite à la résolution des événements inflammatoires, la CRP est utilisée pour surveiller l'évolution de ces états inflammatoires. La CRP est une protéine très stable durant l'entreposage, possède une longue demi-vie (18 à 20 heures), n'est pas affectée par les variations diurnes, ni par l'âge et le sexe (Yeh & Willerson, 2003). Toutes ces caractéristiques en font un très bon marqueur inflammatoire.

#### **I.1.4.4.1 CRP et athérosclérose**

##### **I.1.4.4.1.1 CRP comme marqueur de risque cardiovasculaire**

De multiples évidences démontrent clairement que les niveaux sériques de CRP hautement sensible (hsCRP) sont un important facteur prédictif de futurs accidents cardiovasculaires tant chez les sujets à risque de MCV que chez les sujets sains. Le développement d'une nouvelle méthode de mesure hautement sensible permet maintenant de discriminer des niveaux sériques de CRP se situant entre 0.3 et 10 mg/L; identifiant ainsi les individus à faible risque de MCV (< 1 mg/L), à risque modéré (1 à 3 mg/L) et à risque élevé (> 3 mg/L), tel qu'illustré à la Figure 4. Le taux de hsCRP prédit le développement d'événements ischémiques tant chez les individus présentant un infarctus du myocarde ou de l'angine que chez ceux présentant des antécédents cardiovasculaires (Crea et al., 2002; Liuzzo et al., 1994). Chez les individus n'ayant pas d'antécédents de MCV, la hsCRP est également associée à une augmentation du risque de MCV, tel que démontré par plusieurs études de prévention primaire, incluant la *West of Scotland Coronary Atherosclerosis Prevention Study* (WOSCOPS) (Packard et al., 2000), la *Physician's Health Study* (PHS) (Ridker, Cushman, Stampfer, Tracy, & Hennekens, 1997) et la *Women Health Study* (WHS) (Ridker, Hennekens, Buring, & Rifai, 2000). À noter que dans cette dernière étude, la hsCRP était le meilleur prédicteur d'accidents coronariens, meilleur que le taux de LDL ou que le ratio cholestérol total/HDL et prédisait même le risque de MCV chez les femmes ayant des concentrations normales en LDL.

Chez les individus en santé sans antécédents de MCV, il y a 2 fois plus de risque de souffrir de MCV chez ceux ayant des taux sériques de CRP >3mg/L que chez ceux ayant des taux sériques de CRP <1mg/L (Danesh et al., 2000). Des concentrations de hsCRP dans le plus haut quartile de valeurs mesurées prédisent plusieurs types de MCV, incluant l'infarctus du myocarde (MI) (~ 3 fois plus de risque) (Ridker et al., 2000; Ridker, Rifai, Rose, Buring, & Cook, 2002), l'accident cérébrovasculaire (~ 2 fois plus de risque) (Curb et al., 2003; Ridker et al., 2002) et les maladies artérielles périphériques (Ridker, Cushman, Stampfer, Tracy, & Hennekens, 1998; Ridker, Stampfer, & Rifai, 2001).

Certaines études, après ajustement pour divers facteurs de risques traditionnels, ont observé un pouvoir de prédiction beaucoup plus modéré de la CRP que ce qui avait été initialement rapporté (Danesh et al., 2004; Cushman et al., 2005). Certaines études ont même observé l'absence complète d'association indépendante entre la CRP et le risque de MCV (Khera et al., 2006; Kivimaki et al., 2005). Par contre, dans la "*Rotterdam Study*", la plus grande étude prospective menée jusqu'à ce jour, on a observé qu'après ajustement pour les facteurs de risque traditionnels, les niveaux sériques de CRP étaient fortement et indépendamment associés à la survenue de défaillance cardiaque chez l'homme (ratio de risque, 3.73; 95% IC, 2.40-5.78) (Kardys et al., 2006). Il est également intéressant de noter que les changements apportés à l'hygiène de vie, tels que des changements dans la diète, une augmentation de l'activité physique, l'arrêt du tabagisme et la perte de poids, diminuent les taux de hsCRP. L'ensemble de ces études suggère donc que la CRP représente un marqueur de risque

cardiovasculaire qui, bien que moins puissant qu'initialement rapporté, demeure tout de même fort utile en milieu clinique pour l'évaluation des risques de MCV, particulièrement chez les patients présentant des antécédents de MCV.

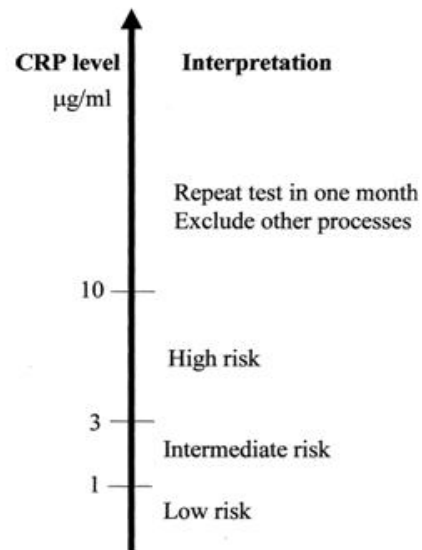


Figure 4. Taux sériques de CRP et risques d'accidents cardio-vasculaires (Ridker PM, 1998).



#### **I.1.4.4.1.2 Rôle de la CRP dans l'athérosclérose**

La CRP fait actuellement l'objet d'intenses recherches pour clarifier son rôle dans l'athérosclérose. En effet, cette molécule perçue initialement comme un simple marqueur de risque cardiovasculaire, est de plus en plus incriminée dans la pathogénèse des MCV. Des études *in vitro* ont démontré que la CRP favorise le chimiotactisme des monocytes et augmente l'expression des molécules d'adhésion, la sécrétion de chémokines, de l'ET-1, diminue l'expression et l'activité d'eNOS et augmente l'expression de PAI-1 et du récepteur de type lectine des LDLox (LOX-1) (Devaraj, Xu, & Jialal, 2003; Pasceri, Willerson, & Yeh, 2000; Verma et al., 2002b; Verma et al., 2002a). La CRP favorise également la formation de cellules spumeuses (Fu & Borensztajn, 2002), inhibe l'efflux du cholestérol de celles-ci (Wang et al., 2008) et stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, incluant l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ , par les monocytes (Ballou & Lozanski, 1992) ainsi que celle du TF (Cermak et al., 1993). La CRP stimule en outre la production de MCP-1 et d'IL-6 par les CML, favorisant ainsi leur prolifération (Hattori, Matsumura, & Kasai, 2003). De plus, de récentes études, ont démontré une diminution des défenses antioxydantes avec production accrue de ROS ainsi qu'une induction de l'apoptose dans des cellules endothéliales progénitrices traitées par la CRP (Fujii, Li, Szmitko, Fedak, & Verma, 2006). La CRP augmente aussi l'expression du récepteur des AGE (RAGE) dans les cellules endothéliales humaines (Zhong et al., 2006) et diminue la sécrétion d'IL-10 par les monocytes dérivés de macrophages humains (Singh et al., 2006).

Chez des souris transgéniques déficientes en apoE surexprimant le gène de la CRP humaine, on a observé une progression accélérée de l'athérosclérose (Paul et al., 2004). En outre, une forte diminution de l'expression de NOS et du NO suite à un traumatisme artériel a été documentée chez des souris surexprimant la CRP humaine (Grad et al., 2007). Notons cependant que dans une récente étude menée chez des souris déficientes en apoE et surexprimant la CRP humaine, aucun effet pro-inflammatoire, pro-athérogénique ou pro-thrombotique de cette protéine n'a été observé (Tennent et al., 2007). Kovacs et coll. (Kovacs et al., 2007) ont même rapporté que la CRP humaine ralentissait le développement de l'athérosclérose chez des souris hypercholestérolémiques. Toutefois, il est important de noter qu'il a récemment été démontré qu'il y a absence d'activation du complément chez les souris déficientes en apoE (Reifenberg et al., 2005). Ceci revêt une importance cruciale lorsque l'on sait que des études ont démontré que les effets pro-inflammatoires de la CRP humaine sont médiés par l'activation du complément (Reifenberg et al., 2005; Pepys et al., 2006).

Par ailleurs, les propriétés de la CRP varient selon l'espèce (Baltz et al., 1982), rendant difficile l'extrapolation chez les humains de résultats obtenus dans des modèles animaux. Des données de la littérature restent contradictoires quant au rôle que pourrait jouer la CRP dans l'athérosclérose *in vivo* et des études supplémentaires s'avèrent nécessaires pour clarifier le tout.

#### **I.1.4.4.2 CRP et diabète de type 2**

Des évidences substantielles indiquent que la CRP est un puissant facteur de prédiction du diabète de type 2. Dans une étude portant sur 2052 hommes âgés de 45 à 74 ans, Thorand et coll. ont observé que les taux de CRP se situant dans le plus haut quartile étaient associés à une augmentation du risque de développer un diabète de type 2 (Thorand et al., 2003). Dans la WOSCAPS (Freeman et al., 2002), la CRP, indépendamment du taux de glucose, des TG à jeun et de l'indice de masse corporelle (IMC), prédisait également le développement du diabète. Finalement, deux études prospectives, l'une portant sur des femmes âgées de 45 ans et plus, l'autre sur des adultes de 65 ans et plus, ont rapporté que parmi les participants, ceux qui développèrent un diabète de type 2 durant les 3 à 4 ans de suivi, avaient des niveaux de base de CRP plus élevés que ceux qui ne développèrent pas la maladie (Barzilay et al., 2001; Pradhan, Manson, Rifai, Buring, & Ridker, 2001).

## **I.2 DIABÈTE DE TYPE 2**

### **I.2.1 Définition**

Le diabète de type 2 est une affection métabolique d'étiologie multiple, caractérisée par une hyperglycémie chronique et un désordre du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Le diabète de type 2 se caractérise par une production hépatique excessive de glucose, un déficit de la sécrétion d'insuline et une résistance à l'insuline. Cette dernière précède le plus souvent le diabète de

plusieurs années. Initialement, la résistance à l'insuline est compensée par l'hyperinsulinémie préservant une tolérance normale au glucose. L'intolérance au glucose se poursuit lorsque la sécrétion d'insuline diminue pour conduire ultérieurement à l'apparition du diabète de type 2, tel qu'illustré à la Figure 5.

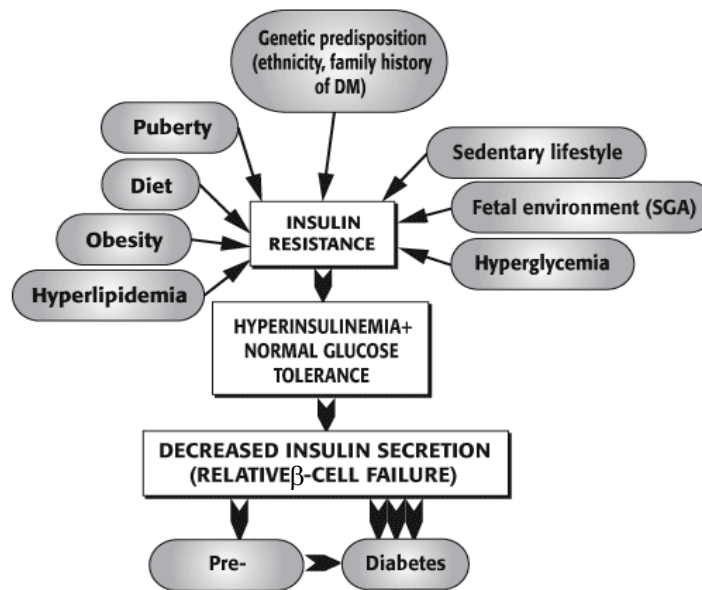


Figure 5. Pathophysiologie du diabète de type 2 (Estrada E, 2004)

### I.2.2 Prévalence

En raison, entre autres, de l'épidémie que constitue l'obésité, du vieillissement de la population et de la sédentarité, le nombre d'individus touchés par le diabète de type 2 atteint des proportions épidémiques. Au cours de la dernière décennie, son incidence a augmenté d'environ 33% et *l'Organisation mondiale de la santé* prévoit que d'ici 2025, le nombre de personnes atteintes de

diabète de type 2 aura doublé de 150 à environ 300 millions (King, Aubert, & Herman, 1998).

### **I.2.3 Diagnostic**

Le diagnostic de la maladie peut être difficile à établir, le début de la maladie étant asymptomatique et insidieux. Pour cette raison, il n'est pas rare que des individus ayant été nouvellement diagnostiqués, présentent déjà des complications vasculaires (Harris, Eastman, Cowie, Flegal, & Eberhardt, 1999). L'association américaine du diabète (2006) a établi pour le diagnostic du diabète, les normes suivantes :

- Glycémie à jeun supérieure ou égale à 7.0 mmol/l. Glycémie similaire lorsque répété quelques semaines plus tard.
- Glycémie supérieure ou égale à 11.1 mmol/l, 2h après l'ingestion de 75 g de glucose.
- Glycémie supérieure ou égale à 7.0 mmol/l lorsque mesurée au hasard, en présence de symptômes de diabète.

Lorsque qu'un test d'hyperglycémie provoquée démontre une glycémie  $\geq 7.8$  et  $\leq 11.1$  mmol/l, 2 heures après l'ingestion de 75g de glucose, on parle alors d'état d'intolérance au glucose. Pour que le diagnostic soit maintenu, on doit obtenir une glycémie dans la même fourchette que préalablement mentionnée lors d'un deuxième test d'hyperglycémie provoquée réalisée quelques semaines plus tard.

## **I.2.4 Épidémiologie**

### **I.2.4.1 Facteurs génétiques**

De fortes évidences démontrent que les gènes jouent un rôle important dans le développement du diabète de type 2 (McCarthy, Froguel, & Hitman, 1994). Des études de prévalence du diabète chez des jumeaux identiques, dans certaines familles et groupes ethniques ont mis ce fait en évidence. Par exemple, des études de migration ont démontré que les prédispositions génétiques varient de manière marquée entre les races vivant dans un même environnement (Elbein, 1997) et que des jumeaux identiques de parents atteints de diabète de type 2 ont 80 à 90 % de chance de développer la maladie (Poulsen, Kyvik, Vaag, & Beck-Nielsen, 1999). Il est en outre maintenant reconnu que les facteurs génétiques sont fortement influencés par l'environnement et que l'interaction entre ces éléments est complexe (So et al., 2000). En effet, des prédispositions génétiques au diabète de type 2 ne pourraient se concrétiser qu'en présence de certains facteurs environnementaux favorables.

### **I.2.4.2 Facteurs environnementaux**

#### **I.2.4.2.1 Diète**

Plusieurs éléments de la diète peuvent augmenter le risque de développement du diabète de type 2. Un faible apport en fibres alimentaires et un indice glycémique élevé des aliments sont associés à une augmentation du risque

de diabète (Hodge, English, O'Dea, & Giles, 2004; Schulze et al., 2004). Une diète riche en lipides, et plus particulièrement en acides gras saturés, augmente la résistance à l'insuline et le risque de diabète (Hodge et al., 2007; Hu, van Dam, & Liu, 2001) tandis qu'une association inverse est observée pour les acides gras insaturés (Meyer, Kushi, Jacobs, Jr., & Folsom, 2001; Wang, Folsom, Zheng, Pankow, & Eckfeldt, 2003). De récentes études ont démontré qu'un ratio élevé acide gras polyinsaturé/saturé est associé à une réduction du risque de diabète, indépendamment des autres facteurs de risques environnementaux et génétiques (Harding et al., 2004) et qu'une diète riche en fibres et produits céréaliers à grains entiers diminuait le risque de développement de diabète de type 2 tant chez l'homme que chez la femme. De plus, les résultats d'études épidémiologiques indiquent qu'une consommation élevée de fruits et légumes réduit les risques de diabète de type 2 (Heidemann et al., 2005; Montonen et al., 2005), tout comme la consommation modérée de café (van Dam, Willett, Manson, & Hu, 2006) et d'alcool (Carlsson, Hammar, & Grill, 2005; Koppes, Dekker, Hendriks, Bouter, & Heine, 2005). En effet, comparativement aux individus ne consommant pas d'alcool, une consommation modérée d'alcool est associée à une réduction de 30 % du risque de développer un diabète de type 2 chez l'homme et chez la femme.

#### **1.2.4.2.2 Activité physique**

L'activité physique améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme lipidique. L'activité physique est indépendamment associée à la prévalence et à l'incidence de diabète de type 2 tant chez l'homme que chez la femme (Laaksonen

et al., 2005; Hussain, Claussen, Ramachandran, & Williams, 2007). Une récente étude a observé une réduction de 42 à 63% du risque de diabète de type 2 avec une activité physique régulière, soit en moyenne 150 min d'exercice physique d'intensité modérée à élevée par semaine (Yates, Khunti, Bull, Gorely, & Davies, 2007). Notons également que chez les individus obèses et diabétiques, certaines études ont rapporté que l'activité physique diminue les concentrations d'insuline (Giacca, Groenewoud, Tsui, McClean, & Zinman, 1998; Koivisto, Pelkonen, Nikkila, & Heding, 1984; Martin, Katz, & Wahren, 1995; Colberg et al., 1996) alors que d'autres études n'ont pas observé cet effet (Jenkins, Furler, Bruce, & Chisholm, 1988; Kang et al., 1996; Minuk et al., 1981).

#### **I.2.4.2.3 Obésité**

L'augmentation fulgurante de l'incidence de l'obésité s'accompagne d'une augmentation concomitante de celle du diabète de type 2. Le lien étroit entre ces deux pathologies a même donné lieu à l'adoption du terme *diabésité*. L'obésité, et plus particulièrement l'obésité abdominale, augmente le risque de diabète de type 2, entre autres, via l'induction d'une résistance à l'insuline (Grundy et al., 2002). Effectivement, il semble que l'obésité abdominale soit le meilleur prédicteur du risque de diabète de type 2 et de l'importance des complications métaboliques qui y sont associées (Despres, 2006b; Despres, 2006a). Rana et coll. (Rana, Li, Manson, & Hu, 2007), dans une étude effectuée chez 68907 infirmières suivies pendant 16 ans, ont observé que les facteurs les plus importants du



développement du diabète de type 2 étaient l'indice de masse corporelle (IMC) et le tour de taille.

#### **I.2.4.2.4 Stress**

La prévalence de dépression chez les patients souffrant de diabète de type 2 est près de trois fois plus élevée que chez les individus sains (Anderson, Freedland, Clouse, & Lustman, 2001). Des évidences suggèrent que la dépression pourrait augmenter les risques de développer un diabète de type 2 (Ali, Stone, Peters, Davies, & Khunti, 2006) et la dépression a été directement ou indirectement liée à un mauvais contrôle glycémique (Lustman et al., 2000). À ce sujet, il est intéressant de noter qu'une récente méta-analyse d'interventions psychologiques chez des patients souffrant de diabète de type 2 suggère des effets bénéfiques d'une psychothérapie sur le contrôle glycémique (Ismail, Winkley, & Rabe-Hesketh, 2004).

### **I.2.5 Physiopathologie du diabète de type 2**

#### **I.2.5.1 Rôle de l'insuline**

L'insuline inhibe la lipolyse, stimule la lipogenèse, la biosynthèse de protéines et d'acide désoxyribonucléique (ADN), inhibe la dégradation des protéines, active le transport de glucose, des acides aminés, des ions et stimule la synthèse de glycogène et la glycolyse. L'insuline inhibe le catabolisme directement en inactivant la glycogène phosphorylase et en supprimant la

sécrétion de glucagon et ses effets hépatiques, soit la glycolyse et la gluconéogenèse. La concentration de ces deux hormones antagonistes maintient donc un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. L'insuline initie ses effets en se liant à la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à insuline, induisant l'autophosphorylation de la sous-unité  $\beta$  de ce récepteur. Ayant acquise une activité tyrosine kinase, cette dernière phosphoryle l'IRS-1, initiant ainsi la cascade de signalisation. La liaison de l'IRS-1 phosphorylée à la sous-unité p85 de la PI-3K, induit l'activation de celle-ci et augmente ultimement la synthèse protéique et le transport du glucose. L'IRS-1 phosphorylée agit en tant que protéine d'arrimage, liant et stimulant la voie de signalisation P21 par l'entremise de son association avec la protéine GRB2 qui interagit avec la protéine SOS du complexe protéique RAS. Ce dernier joue un rôle dans la croissance cellulaire ainsi que dans le métabolisme et la modulation de la synthèse du glycogène. Le complexe RAS une fois activé, active à son tour la kinase raf-1 qui phosphoryle et active les MAPK.

#### **I.2.5.2 Insulinorésistance (IR)**

L'IR peut être définie comme un état de faible sensibilité à l'insuline où l'on observe une atténuation de l'effet stimulant de l'insuline sur la captation de glucose par les tissus périphériques, particulièrement les muscles. L'IR est un élément clé du diabète de type 2 et de l'obésité et est sous contrôle de facteurs de risque génétiques et environnementaux. L'IR dans le tissu adipeux viscéral entraîne une augmentation de la production d'AGL et de la sécrétion de cytokines, ce qui

exacerbe à son tour l'IR dans le foie et les muscles. Au niveau hépatique, l'IR se traduit par une augmentation de la production de glucose, de lipoprotéines de très faibles densité (VLDL) et de TG tandis que dans le muscle squelettique, il y a diminution de la captation de glucose. Cette combinaison de lipotoxicité chronique et d'hyperglycémie entraîne une dysfonction des cellules  $\beta$  du pancréas. La diminution de la sécrétion d'insuline et de la masse des cellules  $\beta$  du pancréas, facilite la détérioration progressive de la tolérance au glucose et entraîne éventuellement l'apparition de diabète de type 2.

#### **I.2.5.2.1 IR hépatique**

Les diabétiques de type 2, ayant une hyperglycémie à jeun modérée, présentent une augmentation de la production de glucose par le foie probablement causée par une réduction de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et la sécrétion de glucagon (DeFronzo, 1992). L'obésité viscérale souvent présente chez les sujets diabétiques de type 2 (Lebovitz & Banerji, 2005), en augmentant d'avantage la libération d'AGL, favoriserait l'IR au niveau hépatique par une diminution par ces AGL de la clairance de l'insuline, de l'inhibition de la glycolyse et par stimulation de la gluconéogenèse (Bjorntorp, 1990). L'importance de l'augmentation de la gluconéogenèse par le foie a été confirmée, entre autres, par des études démontrant que la surexpression chez la souris de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), une enzyme régulant la gluconéogenèse, provoque une hyperglycémie et altère la signalisation de

l'insuline (Sun et al., 2002) et que la suppression de la PEPCK par interférence d'ARN (RNAi), diminue l'hyperglycémie et améliore la tolérance au glucose (Gomez-Valades et al., 2006). Il semble cependant peu probable que l'IR hépatique joue un rôle de premier ordre dans la pathogenèse de cette maladie.

#### **I.2.5.2.2 IR musculaire**

L'altération de la captation de glucose par les muscles squelettiques constitue un défaut majeur dans l'étiologie du diabète de type 2. Chez les individus normaux, la vaste majorité (75 %) du contenu en glucose d'un repas est capté par les muscles où il est mis en réserve sous forme de glycogène. Chez les individus diabétiques de type 2, la captation de glucose et la synthèse de glycogène sont fortement réduites (Kelley, Mokan, & Mandarino, 1992). Chez des souris où l'expression génique du transporteur de glucose (GLUT4) est supprimée, on n'observe pas d'hyperglycémie (Tsao et al., 1999). Ceci laisse supposer que la perte du transport du glucose médiée par l'insuline n'est pas suffisante pour induire le diabète de type 2. Notons par ailleurs qu'on attribue un rôle central au tissu adipeux viscéral dans la pathogénie de l'IR (Bjorntorp, 1990). Il possède en effet une grande activité métabolique, qui entraîne une libération accrue d'AGL dans le système porte. Ces AGL favoriseraient l'IR au niveau musculaire par l'inhibition de la captation de glucose.

### **I.2.5.2.3 IR adipocytaire**

L'IR chez les patients diabétiques de type 2 est associée à une augmentation de l'adiposité viscérale (Lebovitz et al., 2005). L'adiposité viscérale, plutôt que l'adiposité sous-cutanée ou l'obésité totale, est associée de façon indépendante à l'IR. L'IR au niveau du tissu adipeux se traduit par une libération accrue d'AGL dans la circulation sanguine; cette altération métabolique contribue au développement de l'IR au niveau hépatique et musculaire.

#### **I.2.5.2.3.1 Acides gras libres (AGL)**

L'augmentation parallèle des concentrations sériques d'AGL et d'insuline reflète la résistance des adipocytes à l'effet inhibiteur de l'insuline sur la lipolyse. La majorité des gens obèses ont des concentrations élevées d'AGL circulants qui, en inhibant la captation de glucose et la synthèse du glycogène musculaire ainsi que la glycogénolyse, causent l'IR périphérique musculaire et hépatique (Groop et al., 1991; Roden et al., 2000). Chez les individus obèses, la graisse viscérale a un taux basal de lipolyse élevé, est fortement innervée par les nerfs sympathiques, est très sensible à l'action pro-lipolytique des catécholamines et est résistante à l'action anti-lipolytique ainsi qu'à la réestérification des acides gras induite par l'insuline. La graisse viscérale, plutôt que la graisse sous-cutanée, est donc responsable de la quantité disproportionnée d'AGL circulants et les effets métaboliques délétères de ces adipocytes sont accentués lorsqu'ils sont hypertrophiés (Bergman et al., 2007).

Santomauro et coll. (Santomauro et al., 1999) ont confirmé qu'une augmentation des AGL cause l'IR. Ces auteurs ont démontré que l'administration d'Acipimox, un médicament inhibant la lipolyse, à trois groupes de personnes obèses (non-diabétiques, diabétiques de type 2, intolérants au glucose) ou à un groupe de sujets sans surplus pondéral, diminuait les taux plasmatiques à jeun d'AGL de 60 à 70 % et les concentrations d'insuline plasmatique, d'approximativement 50 %. La captation tissulaire de glucose était plus de deux fois supérieure après le traitement avec le médicament comparativement au placebo.

Il est important de noter que les AGL supportent 30 à 50 % de la sécrétion basale d'insuline et que dans le pancréas, ils potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette action stimulatrice sur la sécrétion d'insuline est responsable du fait que la majorité des obèses insulino-résistants (approximativement 80 %) ne développent pas de diabète de type 2, étant capables de compenser leur résistance à l'insuline par une augmentation de la sécrétion d'insuline médiée par les AGL.

### **I.2.5.2.3.2 Adipocytokines**

#### **I.2.5.2.3.2.1 IL-6 et TNF $\alpha$**

L'IL-6 et le TNF $\alpha$  sont deux cytokines surexprimées dans le tissu adipeux et musculaire des patients atteints de diabète de type 2 ou ayant une obésité

viscérale (Hotamisligil, Arner, Caro, Atkinson, & Spiegelman, 1995; Vozarova et al., 2001). Le  $\text{TNF}\alpha$  est un inhibiteur de la phosphorylation insulino-dépendante de la tyrosine de la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 (Hotamisligil et al., 1996) et de ce fait a été impliqué dans le développement de l'IR chez l'homme. Le  $\text{TNF}\alpha$  active en effet une variété de sérines kinases, incluant les JNK, I kappa B kinase bêta ( $\text{IKK}\beta$ ) et la kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IRAK1), ce qui augmente directement ou indirectement la phosphorylation en serine de IRS-1/2, menant à une diminution de l'activité de la PI-3K et de Akt (de, Teruel, Hernandez, & Lorenzo, 2004; Kim et al., 2006), des kinases nécessaires à l'activation du récepteur à insuline. Par ailleurs, si l'utilisation d'un anticorps anti- $\text{TNF}\alpha$  améliore significativement la sensibilité à l'insuline chez des rongeurs (Ventre et al., 1997), cet effet n'a cependant pas été observé chez l'humain (Ofei, Hurel, Newkirk, Sopwith, & Taylor, 1996).

L'IL-6 pour sa part, bien qu'elle fut l'une des premières cytokines impliquée dans l'IR, a un rôle beaucoup plus controversé dans sa genèse (Pedersen et al., 2007). Un polymorphisme dans le gène de l'IL-6 humain, causant une diminution des niveaux circulants d'IL-6, a été associé à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Fernandez-Real et al., 2000) et, chez les patients subissant une chirurgie bariatrique, une diminution des concentrations d'IL-6 a été observée parallèlement à la perte pondérale et a été associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Kopp et al., 2003). Une étude a de plus démontré que la production d'IL-6 par le tissu adipeux viscéral est 3 fois plus élevée

comparativement à celle du tissu adipeux sous-cutané (Fried, Bunkin, & Greenberg, 1998), suggérant que cette cytokine puisse être l'un des facteurs responsables de l'augmentation du risque d'IR associée à l'obésité viscérale. Finalement, il a été proposé que l'IL-6 jouerait un rôle dans l'IR via l'activation des suppresseurs de signalisation de l'insuline (SOCS) qui interfèrent avec la liaison de l'IRS-1 au récepteur de l'insuline et augmente la dégradation de IRS-1 (Senn et al., 2003)

Par ailleurs, de récents travaux suggèrent que l'IL-6 aurait des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline et sur le métabolisme du glucose (Pedersen et al., 2007). L'infusion d'IL-6 recombinante humaine chez des patients diabétiques diminue significativement leur concentration en insuline, suggérant l'effet insulino-sensibilisateur de cette cytokine (Petersen et al., 2005). Carey et coll. (Carey et al., 2006) ont quant à eux démontré que l'administration d'IL-6 à des sujets sains, augmente la captation de glucose induite par l'insuline via l'activation de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate 5' (AMPK), un important régulateur du métabolisme énergétique ainsi que de l'oxydation des acides gras. D'autre part, des souris déficientes en IL-6 développent une intolérance au glucose qui est significativement améliorée suite à l'administration d'IL-6 (Wallenius et al., 2002). À la lumière de ces récentes études, particulièrement celles effectuées chez l'humain in vivo, il semblerait que l'IL-6 jouerait un rôle antagoniste à celui du  $TNF\alpha$  dans la genèse de l'IR. La théorie qui prévaut actuellement est que le  $TNF\alpha$  sécrété par le tissu adipeux serait l'élément



déclencheur derrière l'IR et l'augmentation d'IL-6 observée dans l'IR ne serait que le reflet de cette augmentation de production locale de  $TNF\alpha$ .

#### **I.2.5.2.3.2.2 Résistine**

La résistine est une protéine de signalisation dérivée des adipocytes et nouvellement identifiée. Les concentrations sériques de résistine sont augmentées chez le rat obèse et son immunoneutralisation augmente la sensibilité à l'insuline (Steppan et al., 2001). Les patients diabétiques de type 2 et les obèses non-diabétiques présentent une augmentation des concentrations sériques de résistine (Azuma et al., 2003; Hasegawa et al., 2005). Par contre, de plus récentes études tant chez la souris que chez l'homme, n'ont pas observé d'association entre les concentrations sériques de résistine et celles d'insuline et de glucose (Lee et al., 2003; Lee, Bullen, Jr., Stoyneva, & Mantzoros, 2005; Stejskal et al., 2003). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier le rôle de la résistine dans le diabète humain.

#### **I.2.5.2.3.2.3 Adiponectine**

L'adiponectine est une adipocytokine qui, contrairement aux autres adipocytokines, présente une diminution de son expression et de ses taux sériques dans les cas d'IR et d'obésité (Weyer et al., 2001). Lindsay et coll. (Lindsay et al., 2002) ont observé que les sujets ayant de faibles concentrations sériques d'adiponectine avaient un plus grand risque de développer un diabète de type 2

que les individus ayant une concentration élevée de cette protéine. De plus, Spranger et coll. (Spranger et al., 2003) ont identifié les taux sériques d'adiponectine comme un facteur de risque indépendant de diabète de type 2. L'ensemble de ces études suggère que l'adiponectine aurait un rôle à jouer dans l'IR et le développement du diabète de type 2 et pourrait donc représenter une cible thérapeutique potentielle.

#### **I.2.5.2.3.2.4 Visfatine**

La visfatine est une adipocytokine tout récemment identifiée dont l'expression est plus abondante dans le tissu adipeux viscéral que sous-cutané et qui se lie directement au récepteur à insuline pour mimer ses effets (Fukuhara et al., 2005). Chen et coll. (Chen et al., 2006b) ont observé des concentrations plasmatiques élevées de visfatine chez des patients diabétiques de type 2. La visfatine augmenterait la sécrétion d'IL-6 chez la souris et l'humain, ce qui pourrait promouvoir l'IR (Moschen et al., 2007). À ce stade, le rôle de la visfatine dans l'IR et le diabète reste spéculatif et d'autres études sont nécessaires pour éclaircir son rôle potentiel dans l'étiologie du diabète de type 2.

#### **I.2.5.2.3.2.5 Leptine**

La leptine est une hormone non-glycosylée de 16kDa produite par le tissu adipeux blanc. Produit du gène *ob*, elle détermine le développement de l'obésité chez la souris *ob/ob*. Dû à une déficience en leptine, ces souris développent, entre autres, une obésité morbide associée à une hyperinsulinémie, une IR, un diabète,

une stimulation de l'axe hypothalamo-pituitaire et de l'infertilité. L'administration de leptine à ces souris induit une augmentation du métabolisme basal, une diminution de la prise alimentaire, une réduction du poids corporel et une normalisation des anomalies métaboliques (Zhang et al., 1994). Les souris *db/db* et les rats *fa/fa*, présentent respectivement une absence et une inactivité des récepteurs à leptine et on observe chez ces animaux des anomalies similaires à celles observées chez les souris *ob/ob*. Ces modèles animaux ont mis en évidence le rôle primordial de la leptine dans le métabolisme énergétique et dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. En effet, la leptine est sécrétée par le tissu adipeux en proportion directe des réserves adipeuses et agit au niveau de l'hypothalamus pour augmenter le métabolisme énergétique et diminuer la prise alimentaire (Ahima, 2005).

Si la leptine est majoritairement produite par le tissu adipeux, d'autres tissus tels le placenta, l'intestin, les glandes mammaires, l'épithélium gastrique, les muscles et le cerveau peuvent également la produire à faibles doses dans certaines circonstances (Hoggard et al., 1997). La présence de récepteurs à leptine dans de nombreux tissus contribue à expliquer la grande diversité de fonctions occupées par la leptine que ce soit dans le métabolisme lipidique, l'hématopoïèse, le fonctionnement des cellules pancréatiques, la thermogénèse, le développement fœtal, la reproduction, l'inflammation et la réponse immunitaire (Margetic, Gazzola, Pegg, & Hill, 2002). Les récepteurs à la leptine font partie de la famille des récepteurs à cytokines de classe I. Il existe de nombreux isoformes de récepteurs à leptine : Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re et Ob-Rf. Ces

récepteurs possèdent un domaine extracellulaire de 840 acides aminés, un domaine transmembranaire de 34 acides aminés et un domaine intracellulaire de longueur variable, caractéristique de chaque isoforme. Seul l'isoforme de pleine longueur, Ob-Rb, est impliqué dans la signalisation par la leptine et est considéré comme le récepteur fonctionnel. Comme les autres récepteurs de la famille des récepteurs à cytokines de classe I, la leptine, une fois liée au récepteur Ob-Rb, active la voie de signalisation Janus kinases et protéines de transduction et de régulation de la transcription (JAK/STAT) (Baumann et al., 1996).

Bien qu'il existe chez l'humain des cas de déficience génétique en leptine (Montague et al., 1997), la plupart des sujets obèses et des animaux chez lesquels on a induit l'obésité par la diète, présentent des taux sériques de leptine élevés, reflétant l'augmentation de la masse adipeuse et une résistance hypothalamique à la leptine (Considine et al., 1996).

#### **1.2.5.2.3.2.5.1 Leptine et diabète**

Bien que les concentrations sériques de leptine soient augmentées chez les patients diabétiques de type 2 (Kowalska, Strackowski, & Kinalska, 1998; Fischer et al., 2002), il existe relativement peu d'études épidémiologiques étudiant le rôle potentiel de la leptine sur le développement du diabète de type 2. Chez des américains d'origine japonaise, des concentrations sériques basales de leptine plus élevées ont été associées à une augmentation du risque de développer un diabète de type 2 chez l'homme mais pas chez la femme (McNeely et al., 1999). Aux îles Maurice, il a été rapporté que le risque de diabète s'accroissait avec

l'augmentation des taux de leptine, plafonnant à des taux élevés (Boyko, Fujimoto, Leonetti, & Newell-Morris, 2000). Plus récemment, il a été démontré que des taux de leptine élevés prédisaient la détérioration de l'état d'intolérance au glucose chez les adultes de race blanche (Franks et al., 2005). Les associations observées pourraient être dues aux effets délétères directs de la leptine sur le métabolisme du glucose mais de tels effets n'ont pas été observés de façon consistante dans différents modèles expérimentaux (Ceddia, Koistinen, Zierath, & Sweeney, 2002; Yildiz & Haznedaroglu, 2006; Zhao, Feng, & Chen, 2006). En fait, plusieurs études chez l'animal suggèrent même un rôle protecteur de la leptine dans le développement du diabète (Minokoshi et al., 2002; Shimabukuro et al., 1997; Toyoshima et al., 2005).

Il est possible que les associations entre leptine et diabète rapportées précédemment soient attribuables à la résistance à l'insuline chez ces sujets, progressant vers le diabète. Tout comme les effets bénéfiques de la leptine sur le diabète pourraient avoir été obscurcis par cette même résistance. En ajustant pour des facteurs liés à la résistance à la leptine tels que les marqueurs d'inflammation et l'insulinémie à jeun, Schmidt et coll. ont récemment démontré que des concentrations élevées de leptine prédisaient un risque accru de développer un diabète de type 2 (Schmidt et al., 2006). Prises dans leur ensemble, ces données laissent suggérer que la leptine puisse représenter un facteur de risque du diabète de type 2.

### I.2.5.2.3.2.5.2 Leptine et athérosclérose

Plusieurs études, tant chez l'animal que chez l'humain, viennent appuyer un rôle pro-athérogénique de la leptine. Premièrement, divers travaux ont démontré que les souris *ob/ob*, *db/db* et les rats *fa/fa*, malgré une obésité sévère et un profil métabolique pro-athérogénique, sont résistantes à l'athérosclérose (Schafer et al., 2004; Stephenson et al., 2003; Park et al., 2001). Notamment, Taleb et coll. (Taleb et al., 2007) ont récemment démontré chez la souris *ob/ob* déficiente en récepteurs à LDL (*LDR<sup>-/-</sup> ob/ob*), un développement moins important de lésions athérosclérotiques que chez la souris ayant des niveaux normaux de leptine (*LDR<sup>-/-</sup> /*). Cet effet serait attribuable aux effets immunomodulateurs de la leptine, notamment sur l'amélioration de la réponse immunitaire aux cellules T régulatrices (Taleb et al., 2007). Il faut cependant noter l'existence d'autres études démontrant, chez ces mêmes souris, un développement plus important de lésions athérosclérotiques que chez les souris ayant des niveaux normaux de leptine (Hasty et al., 2001; Mertens et al., 2003). Ce fait serait probablement dû à d'additionnelles anomalies métaboliques chez ces souris plutôt qu'à une absence d'effet protecteur de l'absence de leptine. Cette hypothèse est appuyée par des données démontrant une réduction significative des lésions athéromateuses chez ces souris, associée à une amélioration du métabolisme glucidique et lipidique, suite à une perte pondérale (Verreth et al., 2004). Deuxièmement, l'administration de leptine à des souris *ApoE<sup>-/-</sup>* augmente et aggrave les lésions athérosclérotiques chez celles-ci (Bodary et al., 2005; Chiba et al., 2007). Finalement, des études épidémiologiques, telles que la WOSCOPS, ont démontré

que, chez plus de 1000 individus suivis pendant 5 ans, des concentrations sériques élevées en leptine prédisaient les accidents cardiovasculaires aigus et que les individus se situant dans les deux plus hauts quintiles de concentrations en leptine avaient deux fois plus de risques cardiovasculaires que les individus se situant dans le plus bas quintile et ce même après ajustement pour l'IMC, les lipides plasmatiques, le glucose et la CRP (Wallace et al., 2001).

Soderberg et coll. (Soderberg et al., 1999a; Soderberg et al., 2004) ont également démontré que les concentrations sériques en leptine étaient fortement associées à une augmentation du risque de subir un premier accident cérébrovasculaire (ACV) hémorragique. Ces résultats furent par la suite confirmés dans une plus grande étude (Thogersen et al., 2004). Les concentrations de leptine sont également corrélées à l'épaississement de l'intima-media (IMT) de l'artère carotide commune, un marqueur d'athérosclérose sous-clinique (Ciccione et al., 2001). Finalement, il est intéressant de noter que les interventions thérapeutiques à l'aide de statines, fibrates ou TZDs, chez les patients souffrant de diabète et/ou de MCV, diminuent la production de leptine (Zhao & Wu, 2005; Toruner et al., 2004; De et al., 1996) tout comme une diète riche en acides gras polyinsaturés  $\omega 3$  (Winnicki et al., 2002).

La dysfonction endothéliale, l'étape la plus précoce du processus athérosclérotique, est affectée par la leptine. Chez l'animal, des récepteurs fonctionnels à la leptine ont été identifiés au niveau de l'endothélium et l'administration de leptine, à des concentrations pathophysiologiques, altère la

vasorelaxation NO-dépendante de l'endothélium (Knudson et al., 2005). L'administration de leptine à raison de 0.5mg/kg/jour à des rats normaux, diminue, entre autres, leur production de NO au niveau systémique et dans le rein (Beltowski, Wojcicka, Marciniak, & Jamroz, 2004). De façon inverse, chez des souris *ob/ob* la fonction endothéliale est altérée et l'administration de leptine améliore la relaxation NO-dépendante (Winters et al., 2000). Il est possible que les effets bénéfiques de la leptine dans ce modèle expérimental soient attribuables à l'amélioration des différentes anomalies métaboliques rencontrées chez ces souris obèses.

Chez l'humain, plusieurs études suggèrent que la leptine puisse également induire la dysfonction endothéliale. Chez les sujets obèses, les concentrations plasmatiques de leptine sont inversement associées à la vasorelaxation coronarienne NO-dépendante (Sundell, Huupponen, Raitakari, Nuutila, & Knuuti, 2003) et la concentration de leptine est positivement corrélée avec les niveaux plasmatiques de sTM et de VCAM-1, deux marqueurs de l'activation/dommage endothélial (Porreca et al., 2004a). Une diminution de ces marqueurs est observée suite à une baisse des concentrations de leptine au cours d'un programme de perte pondéral. À l'inverse, certaines études n'ont pas observé d'effets de la leptine sur la fonction endothéliale tant chez des hommes et adolescents sains que chez des femmes obèses (Cleland et al., 2000; Oflaz et al., 2003; Singhal et al., 2002). In vitro, la leptine augmente l'expression de l'ET-1 (Quehenberger et al., 2002), du MCP-1 (Bouloumie, Marumo, Lafontan, & Busse, 1999; Yamagishi et al., 2001) et de la CRP (Singh, Hoffmann, Wolk,



Shamsuzzaman, & Somers, 2007) par les cellules endothéliales et, à des doses telles que celles observées dans l'obésité et le diabète de type 2, elle diminue la vasorelaxation acétylcholine-dépendante de l'endothélium (Knudson et al., 2005). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier le rôle de la leptine dans la régulation de la fonction endothéliale chez l'humain.

La leptine jouerait aussi un rôle dans le métabolisme lipidique au niveau de la paroi vasculaire. Plusieurs études chez l'humain ont démontré une relation inverse entre la leptine et les niveaux de HDL cholestérol et/ou d'apo A1 (Hergenc, Schulte, Assmann, & von, 1999; Rainwater, Comuzzie, VandeBerg, Mahaney, & Blangero, 1997). Chez l'animal, il a été démontré que la leptine pouvait augmenter l'accumulation d'ester de cholestérol dans les cellules spumeuses, particulièrement dans des conditions élevées en glucose (O'Rourke, Yeaman, & Shepherd, 2001) et une diminution de l'accumulation de cholestérol dans les macrophages a été documentée chez les souris *ob/ob* (Kjerrulf et al., 2006). Une série d'études ont également démontré que la leptine pourrait promouvoir, via la surexpression du récepteur "scavenger" de type B1, le catabolisme des HDL hépatiques et la diminution des concentrations plasmatiques de HDL chez les souris *ob/ob* (Lundasen, Liao, Angelin, & Rudling, 2003; Silver, Jiang, & Tall, 1999; Silver, Wang, & Tall, 2000). Ces études suggèrent donc que la leptine puisse favoriser l'accumulation de cholestérol au niveau de la paroi vasculaire et altérer son catabolisme dans les tissus périphériques en diminuant les concentrations en HDL.

La leptine jouerait également un rôle dans l'inflammation. Outre, son effet immunomodulateur au niveau des cellules hématopoïétiques, incluant les monocytes et les macrophages, la leptine augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (Loffreda et al., 1998). Chez des individus de poids normal et chez les sujets obèses, il existe une corrélation entre les concentrations sériques de leptine et celles de marqueurs inflammatoires tels la CRP et l'amyloïde sérique A (SAA) (Kazumi, Kawaguchi, Hirano, & Yoshino, 2003; Shamsuzzaman et al., 2004; van Dielen et al., 2001). L'administration de leptine à des individus de poids normal mais non à des sujets obèses, induit une augmentation significative des concentrations sériques de CRP (Hukshorn et al., 2002). De plus, on observe une diminution parallèle des taux plasmatiques de leptine et de CRP lors d'un jeûne de courte durée chez les individus obèses (Canavan et al., 2005). L'ensemble de ces études suggère que la leptine puisse contribuer à l'état pro-inflammatoire associé à l'obésité.

La leptine est également impliquée dans le stress oxydatif. Le stress oxydatif, et particulièrement l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques, joue un rôle important dans l'athérosclérose. Bouloumie et coll. (Bouloumie et al., 1999) ont démontré que la leptine, à des doses physiologiques et pathophysiologiques (1-100ng/ml), augmente la production de ROS dans les cellules endothéliales. Cette augmentation de ROS est accompagnée d'une augmentation de l'activité des JNK, de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B et d'une surexpression de MCP-1. Dans des cellules endothéliales bovines, la leptine, à des concentrations physiologiques (10 ng/ml), augmente la production de

ROS en stimulant l'oxydation des acides gras au niveau mitochondrial (Yamagishi et al., 2001). La leptine exerce également ses effets pro-oxydatifs au niveau des CML (Li, Mamputu, Wiernsperger, & Renier, 2005). Beltowski et coll. (Beltowski, Wojcicka, & Jamroz, 2003) ont également démontré que l'administration de leptine (0.25 mg/kg) in vivo, deux fois par jour pendant sept jours chez le rat, augmentait les concentrations plasmatiques de plusieurs produits de peroxydation des lipides et l'excrétion urinaire d'isoprostanés, un marqueur sensible et spécifique du stress oxydatif. Il a de plus été récemment démontré que l'administration de leptine à des souris, augmentait les niveaux d'hydroperoxydes lipidiques et diminuait les taux de glutathion dans les tissus cérébraux (Kutlu et al., 2005).

Chez l'humain, Porreca et coll. (Porreca et al., 2004b) ont observé une corrélation significative entre les niveaux de leptine plasmatique et les taux de LDLox chez 60 femmes saines post-ménopausées et dans une étude menée auprès de 259 américains d'origine japonaise, une corrélation a été observée entre les taux plasmatiques de leptine et les niveaux d'excrétion urinaire d'isoprostanés, ceci indépendamment de l'âge, du sexe et du tabagisme (Nakanishi et al., 2005). Konukoglu et coll. (Konukoglu, Serin, & Turhan, 2006) ont aussi observé que des concentrations élevées en leptine, chez des femmes obèses avec ou sans hypertension, étaient associées à une augmentation des niveaux de stress oxydatif et de peroxydation lipidique et à une diminution des métabolites du NO. Mentionnons également que de nombreuses études, tant chez l'animal que chez l'humain, ont observé que la leptine diminuait les concentrations de PON1, enzyme jouant un rôle clé dans l'athérosclérose en prévenant la modification oxydative des

lipoprotéines plasmatiques (Beltowski et al., 2003; Beltowski, Jamroz-Wisniewska, Borkowska, & Wojcicka, 2005; Ferretti et al., 2005; Uzun et al., 2004).

Les mécanismes à la base des augmentations de ROS observées ne sont pas encore complètement élucidés mais il semble que la NADPH oxydase (Li et al., 2005) et la chaîne respiratoire mitochondriale (Yamagishi et al., 2001) soient impliquées. De plus, la forme inductible des synthases du monoxyde d'azote (iNOS) peut engendrer du stress oxydatif en produisant de grandes quantités de NO et il a été démontré que la leptine pouvait augmenter l'expression d'iNOS dans les macrophages (Raso et al., 2002). Ces études suggèrent que le stress oxydatif puisse jouer un rôle clé comme médiateur des effets délétères de la leptine sur le système cardiovasculaire.

La leptine jouerait également un rôle dans deux processus impliqués dans l'athérosclérose, soit l'agrégation plaquettaire et les troubles de la coagulation/fibrinolyse. En effet, il a été rapporté que la leptine à des doses observées chez l'obèse (>30 ng/ml), augmentait l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine diphosphate (ADP) (Nakata, Yada, Soejima, & Maruyama, 1999; Corsonello, Malara, Ientile, & Corica, 2002) ainsi que l'expression de P-sélectine par les plaquettes humaines in vitro (Wallaschofski et al., 2004). Notons par contre qu'une étude utilisant des concentrations aussi élevées que 500 ng/ml de leptine, n'a pas observé d'effet sur l'agrégation plaquettaire (Ozata et al., 2001a). Une récente étude de Giandomenico et coll. (Giandomenico, Dellas, Czekay, Koschnick, & Loskutoff, 2005) explique que ceci serait attribuable au fait que la leptine augmenterait l'agrégation plaquettaire chez seulement environ 40 % des individus

étudiés (“répondants”), les individus non-répondants exprimant de plus faibles quantités de récepteurs à leptine sur leurs plaquettes.

Finalement, les concentrations de leptine sont corrélées à celles de PAI-1 chez les hommes atteints de maladie cardiaque ischémique ainsi que chez les femmes post-ménopausées (Thogersen et al., 2004; De, V et al., 1999). Ajoutons également qu’une forte corrélation est observée entre les concentrations sériques de leptine et celles de fibrinogène, de PAI-1 et de vWF (Chu et al., 2001; Soderberg, Olsson, Eliasson, Johnson, & Ahren, 1999b) et qu’une corrélation inverse entre les concentrations sériques de leptine et celles de t-PA a également été observée (Soderberg et al., 1999b). Napoleone et coll. ont de plus récemment démontré que la leptine pouvait induire l’expression de TF dans les cellules mononucléaires périphériques sanguines (PBMC) (Napoleone et al., 2007).

La leptine a de plus été démontrée comme pouvant augmenter, in vitro, l’hypertrophie, la prolifération et la migration des CML chez le rat et chez l’humain (Li et al., 2005; Oda, Taniguchi, & Yokoyama, 2001; Shin et al., 2005) et pourrait favoriser le remodelage vasculaire en stimulant la synthèse et la sécrétion d’ET-1 par les cellules endothéliales (Quehenberger et al., 2002). Cet effet de la leptine sur l’ET-1 est cependant encore controversé puisque dans une récente étude, aucun effet de la leptine sur l’ET-1 n’a été observé (Takahashi, Totsune, Sone, Kikuchi, & Murakami, 2005). Notons également que la leptine stimule la synthèse de TGF- $\beta$  par les cellules endothéliales et que les concentrations plasmatiques de leptine sont corrélées aux concentrations de TGF- $\beta$  chez des patients hypertendus

(Wolf et al., 1999; Porreca et al., 2002). Finalement, d'autres chercheurs ont démontré que la leptine avait une activité angiogénique tant in vitro que in vivo (Sierra-Honigmann et al., 1998) et pouvait augmenter la calcification des cellules vasculaires (Parhami, Tintut, Ballard, Fogelman, & Demer, 2001).

### **I.2.6 Complications micro-vasculaires du diabète de type 2**

Ces complications sont principalement la néphropathie, la rétinopathie et la neuropathie. Elles sont en grande partie attribuables à l'effet toxique de l'hyperglycémie prolongée. Il a été démontré par la *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) (1998a) qu'un contrôle adéquat de la glycémie induit une diminution importante du développement et de la progression des complications micro-vasculaires.

#### **I.2.6.1 Néphropathie**

Le diabète constitue la première cause d'insuffisance rénale chronique (Bate & Jerums, 2003). Le taux de mortalité est de l'ordre de 20 à 40 fois plus élevé chez les diabétiques avec néphropathie que chez les diabétiques n'étant pas atteints de cette pathologie (Bouhanick, Berrut, Fabbri, Fressinaud, & Marre, 1996). La néphropathie diabétique est caractérisée à ses débuts par une microalbuminurie. La progression vers l'insuffisance rénale chronique est associée à une protéinurie persistante et à une hypertension artérielle (Bate et al., 2003).

### **I.2.6.2 Rétinopathie**

80% des diabétiques de type 2 présentent un certain degré de rétinopathie et 20% d'entre eux présentent une rétinopathie de type proliférative (Klein, Klein, & Moss, 1995). A son stade précoce, elle se caractérise par une perméabilité vasculaire accrue avec œdème rétinien, micro-anévrysmes et hémorragies ponctuelles. Lui succède la phase proliférative, caractérisée par la formation de nouveaux vaisseaux dans la rétine et par la présence d'hémorragies. La rétinopathie diabétique peut éventuellement mener à un décollement de la rétine et à la cécité (Bate et al., 2003).

### **I.2.6.3 Neuropathie**

La neuropathie diabétique consiste en l'atteinte des nerfs périphériques, moteurs, sensoriels et autonomes. Causant une diminution de la sensibilité cutanée, elle peut dans les cas de complications sévères, mener à l'amputation. Ces altérations peuvent être accompagnées d'infection des membres inférieurs et de septicémie (Coleman, 1997).

### **I.2.7 Complications macro-vasculaires du diabète de type 2**

Ces complications incluent les accidents cardiovasculaires, cérébrovasculaires et les MCV périphériques. 80% des décès chez les diabétiques de type 2 sont attribuables aux complications macro-vasculaires, ce qui en fait la première cause de mortalité chez les diabétiques. En effet, des études cliniques et épidémiologiques ont observé que les individus diabétiques de

type 2 ont un taux de mortalité cardiovasculaire de 2 à 4 fois supérieur à celui de la population générale (Gu, Cowie, & Harris, 1998; Luscher, Creager, Beckman, & Cosentino, 2003; Stamler, Vaccaro, Neaton, & Wentworth, 1993). La prévalence de la maladie vasculaire périphérique chez les diabétiques de type 2 est quant à elle de 22 % (Howard, 1996).

La UKPDS est une étude de cohorte de plus de 5000 sujets diabétiques, s'étalant sur une période de 20 ans et dont l'objectif principal était de vérifier l'effet potentiellement préventif d'un contrôle glycémique serré sur les complications micro- et macro-vasculaires associées au diabète de type 2. Les résultats de cette étude ont démontré que l'amélioration du contrôle glycémique réduisait ces deux types de complications vasculaires, bien que la diminution des complications macro-vasculaires ne soit pas statistiquement significative. Une diminution de 1% de l'hémoglobine glyquée s'accompagnait d'une réduction de 18 % des risques d'infarctus du myocarde et de 25 % du risque de mortalité associé au diabète de type 2 (1998b).

La pathogenèse des MCV associées au diabète de type 2 est multifactorielle et peut être affectée par de multiples 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 au cours des dernières années pour tenter d'expliquer ce phénomène (Tableau I).



---

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

---

- Dyslipidémies : LDL petites et denses, ↑ LDL oxydées et glyquées, ↑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 (Eckel & Krauss, 1998)*

### **I.2.7.1 Facteurs de risque traditionnels**

#### **I.2.7.1.1 Hyperglycémie**

Il subsiste toujours un débat à savoir si l'hyperglycémie représente un facteur de risque important du développement des complications macro-vasculaires dans le diabète de type 2. Bien que plusieurs études dont la UKPDS (1998b) n'aient pas observé d'association entre l'hyperglycémie et les complications macro-vasculaires associées au diabète de type 2, plusieurs études soutiennent que l'hyperglycémie, et particulièrement les excursions

hyperglycémiques post-prandiales, sont un facteur de risque des MCV (Gerich, 2006; Ceriello, 2005). Les médiateurs des effets délétères de l'hyperglycémie sur le système vasculaire incluent l'activation de la voie des pentoses ou polyols, la formation des AGE, l'activation de la PKC et le stress oxydatif (King, 1996).

#### **I.2.7.1.2 Dyslipidémies**

Les patients diabétiques de type 2 présentent un profil lipidique hautement athérogène, caractérisé par une augmentation des TG, une diminution des niveaux de HDL cholestérol ainsi que par la présence de LDL petites et denses. Bien que les concentrations en LDL des diabétiques de type 2 soient semblables à celles des individus sains, une baisse des concentrations en LDL chez des patients diabétiques de type 2, diminue les risques de MCV (Sever et al., 2005). La prévalence d'hypertriglycémie et de la diminution des niveaux de HDL sériques chez les sujets diabétiques est approximativement deux fois plus élevée que chez les individus sains (Solano & Goldberg, 2006). Les diabétiques de type 2 présentent non seulement des LDL petites et denses mais également une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) plasmatique (Krentz, 2003). Ces deux altérations sont associées à une augmentation des risques de MCV. Les faibles concentrations de HDL chez les patients diabétiques de type 2, en plus de diminuer les effets antioxydants et anti-athérogéniques de celles-ci, sont associées à une augmentation du risque de MCV (Swan, 1999). L'ensemble de ces études indiquent que les dyslipidémies constituent un facteur de risque indépendant des MCV dans le diabète de type 2.

#### **I.2.7.1.3 Hypertension**

L'hypertension constitue un facteur de risque indépendant des MCV dans le diabète de type 2. L'hypertension est approximativement 2 fois plus fréquente chez les patients diabétiques que chez les non diabétiques (Mancia, 2005). Les risques d'infarctus du myocarde sont associés à la tension artérielle chez les diabétiques de type 2 (Adler et al., 2000). L'hypertension est de plus souvent associée à l'IR, l'hyperinsulinémie et la protéinurie qui sont tous des facteurs de risque de MCV (Stamler et al., 1993; Adler et al., 2000).

#### **I.2.7.1.4 Tabagisme**

Le tabagisme représente un facteur de risque de MCV chez les sujets sains et chez les diabétiques de type 2 (Karim, Buchanan, Hodis, Li, & Mack, 2005). La cigarette semble de plus agir avec l'hypercholestérolémie de manière synergistique afin d'accélérer le développement de MCV dans le diabète, possiblement en augmentant l'oxydation des LDL (Heitzer et al., 1996).

#### **I.2.7.1.5 Obésité**

L'obésité, et plus particulièrement l'obésité abdominale, représente un important facteur de risque de diabète de type 2 et est associée à l'IR, la dyslipidémie, l'hypertension et à une augmentation du risque de MCV (Despres, 2006a).

### **I.2.7.2 Nouveaux facteurs de risque et mécanismes physiopathologiques**

Plusieurs études ont démontré que les facteurs de risque traditionnels n'expliquent qu'en partie l'incidence accrue du développement de MCV chez les patients diabétiques de type 2 et il n'existe pas encore d'évidences démontrant clairement que le contrôle de l'hyperglycémie chez ces patients, diminue les complications macro-vasculaires dans le diabète de type 2. Ceci a mené à l'identification de nouveaux facteurs de risque associés à l'IR, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie. Ces nouveaux facteurs de risque incluent la dysfonction endothéliale, l'altération de la coagulation, le stress oxydatif et l'inflammation systémique.

#### **I.2.7.2.1 Dysfonction endothéliale**

Les patients diabétiques de type 2 présentent une dysfonction endothéliale telle que déterminée par la mesure de la réactivité vasculaire et par un accroissement chez ces individus de divers marqueurs systémiques de dysfonction endothéliale, incluant les molécules d'adhésion solubles et le PAI-1 (Festa, D'Agostino, Jr., Tracy, & Haffner, 2002; Ribau, Hadcock, Teoh, DeReske, & Richardson, 1999). Les femmes souffrant de diabète gestationnel, les obèses et les sujets insulino-résistants présentent également une dysfonction endothéliale. L'hyperglycémie est l'hypothèse la plus rapportée pour expliquer le lien entre le diabète, la dysfonction endothéliale et le développement de l'athérosclérose (Bagg et al., 2001). Un lien entre la dysfonction endothéliale et l'inflammation est aussi établi au vu de l'association entre l'état de dysfonction endothéliale et divers

marqueurs de l'inflammation comme la CRP. Une relation réciproque entre la dysfonction endothéliale et l'IR est enfin bien documentée (Kim et al., 2006) et l'IR est associée à une augmentation du risque de MCV, suggérant que la dysfonction endothéliale puisse constituer un lien entre l'IR et l'athérosclérose.

#### **I.2.7.2.2 Altérations de la coagulation**

Le diabète de type 2 est associé à un état d'hypercoagulabilité, avec diminution de la fibrinolyse, activation plaquettaire et augmentation de l'agrégation plaquettaire. Ceci se reflète par une augmentation des concentrations plasmatiques de vWF, facteur VII, facteur VIII, facteur plaquettaire 4 et de PAI-1 (Colwell, 2001; Biondi-Zoccai, Abbate, Liuzzo, & Biasucci, 2003; Dunn & Grant, 2005). Une élévation de certains marqueurs de la cascade de la coagulation/fibrinolyse est associée à un risque accru de MCV. En effet, le PAI-1, le t-PA et la sTM ont été identifiés comme facteurs de risque de l'infarctus du myocarde (Thompson et al., 1995). De plus, les concentrations élevées de TF, PAI-1 et la diminution de celles de t-PA pourraient être associées à l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes dans le diabète de type 2 (Biondi-Zoccai et al., 2003).

#### **I.2.7.2.3 Stress oxydatif**

Les sujets diabétiques de type 2 présentent une augmentation des niveaux de stress oxydatif (Baynes, 1991). Cette altération se reflète, entre autres, par une augmentation des taux plasmatiques et urinaires de 8-isoprostane et de

substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), des marqueurs de peroxydation lipidique. L'hyperglycémie induirait la génération de radicaux libres par différentes voies : la voie de l'autoxydation du glucose, la glycation des protéines, la voie des polyols, et l'activation de la PKC. Les lipoprotéines chez les sujets diabétiques sont davantage glyquées, ce qui les rend plus susceptibles à l'oxydation (Freitas, Filipe, & Rodrigo, 1997). Plusieurs marqueurs de stress oxydatif tels que la myeloperoxydase (MPO), la lipoprotéine-phospholipase  $A_2$  (Lp-PLA<sub>2</sub>), les phospholipides oxydés et les isoprostanes sont intensément étudiés pour clarifier leur rôle dans les MCV associées au diabète de type 2 (Haidara, Yassin, Rateb, Ammar, & Zorkani, 2006). Bien que pour plusieurs de ces marqueurs, il n'existe pas encore d'association claire avec le risque de MCV, certains d'entre eux comme la MPO ont été associés à une augmentation du risque de dysfonction endothéliale et de MCV (Cavusoglu et al., 2007; Mocatta et al., 2007; Nambi, 2005; Vita et al., 2004).

#### **I.2.7.2.4 IR**

Bien que le rôle de l'IR en tant que facteur de risque indépendant du développement des complications macro-vasculaires dans le diabète de type 2 demeure incertain, elle est par contre associée à plusieurs facteurs de risque reconnus incluant, entre autres, l'hypertension, les dyslipidémies et l'obésité (Despres, 2006a). Tel que mentionné précédemment, l'IR peut contribuer à la vaculopathie diabétique par son effet inducteur sur la dysfonction endothéliale

mais également via d'autres mécanismes, soit les dyslipidémies, l'hypertension et les troubles de la coagulation (Ginsberg, 2000).

L'IR augmente l'hydrolyse des TG du tissu adipeux ainsi que la libération des AGL dans la circulation. Cette IR périphérique se caractérise par un influx abondant d'AGL au foie, une altération de la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes, menant à une augmentation de la sécrétion de VLDL (Wetsel et al., 1999). De plus, les VLDL stimulent le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et favorisent l'enrichissement en TG des HDL et le catabolisme d'apoA-1, ayant pour effet non seulement d'augmenter le catabolisme des HDL mais de diminuer leur capacité à évacuer le cholestérol (Ginsberg, 2000). L'augmentation des concentrations de VLDL et de leur contenu en esters de cholestérol se traduit par un accroissement de leur entrée et de leur accumulation dans la paroi vasculaire et dans les plaques athérosclérotiques ainsi que par une augmentation de leur athérogénicité (Nordestgaard et al., 1994). L'augmentation des VLDL circulants peut également contribuer à l'hyperlipidémie postprandiale qui constitue un facteur de risque indépendant des MCV (Ginsberg, 1995). Ajoutons que la diminution des concentrations de HDL et des niveaux d'apoA-1 et l'augmentation des LDL petites et denses sont également associées à un risque accru de MCV (Ginsberg, 2000). L'ensemble de ces données indique que l'IR pourrait contribuer à la vasculopathie diabétique via les dyslipidémies qu'elle induit.

Par ailleurs, l'augmentation de l'hypertension constitue un autre mécanisme par lequel l'IR pourrait contribuer à l'athérosclérose diabétique. Des anomalies dans la vasodilatation et dans le flux sanguin fourniraient un lien entre l'IR et

l'hypertension. En effet, l'administration d'insuline chez des sujets sains produit une vasodilatation de l'endothélium mais cette réponse est déficiente chez les sujets insulino-résistants et chez les sujets présentant un diabète de type 2 (Laakso et al., 1990). Cette déficience serait attribuable à l'incapacité de l'insuline de stimuler la sécrétion de NO par les cellules endothéliales (Steinberg, 2007). Finalement, le rôle de l'hypertension comme mécanisme médiant les effets délétères de l'IR sur la vasculopathie diabétique est fortement suggéré par les résultats d'essais cliniques où l'administration de sensibilisateurs à l'insuline (TZDs et metformine) diminue la pression sanguine chez les patients insulino-résistants et réduit l'incidence d'accidents coronariens (Panunti et al., 2005).

Finalement, tel que mentionné plus tôt (section 1.2.7.2.2), plusieurs facteurs impliqués dans la coagulation/fibrinolyse sont augmentés dans le diabète de type 2 et sont associés à un risque accru de MCV. Parmi ceux-ci, le fibrinogène, le facteur VIII et le PAI-1 sont augmentés chez les sujets insulino-résistants (Colwell, 2001; Biondi-Zoccai, Abbate, Liuzzo, & Biasucci, 2003; Dunn & Grant, 2005). Les mécanismes responsables de l'augmentation de fibrinogène dans l'IR ne sont pas clairs mais pourraient être liés à l'obésité (Ginsberg, 2000). L'activité du facteur VIII a été observée dans l'hyperlipidémie post-prandiale, induite par l'IR, ce qui suggère un risque accru d'accidents cardiovasculaires aigus chez les sujets insulino-résistants suite à la consommation d'un repas riche en matières grasses (Miller, 1995). Finalement, le lien entre l'IR et le PAI-1 a été étudié de manière extensive in vitro et il a été démontré qu'un excès d'insuline dans les cellules endothéliales et hépatiques augmente la sécrétion de PAI-1, un important



marqueur de risque d'accidents cardiovasculaires prématurés (Dunn et al., 2005). L'ensemble de ces études suggère que les troubles de la coagulation constituent un des mécanismes par lesquels l'IR contribue à la vasculopathie diabétique.

#### **I.2.7.2.5 Inflammation systémique**

Depuis la découverte faite par Liuzzo et coll. (Liuzzo et al., 1994) que des marqueurs d'inflammation systémique prédisaient la survenue d'accidents cardiovasculaires chez les individus présentant de l'angine instable, de nombreuses autres études sont venues appuyer un rôle potentiel de divers marqueurs inflammatoires comme prédicteurs du risque de développement de MCV et d'accidents coronariens chez les individus ayant une histoire de MCV. Ces marqueurs inflammatoires semblent offrir de l'information prédictive indépendante ou possiblement complémentaire aux facteurs de risque traditionnels (Levinson, 2006). Une augmentation des concentrations plasmatiques de CRP, d'IL-6, de fibrinogène, des molécules d'adhésion, de SAA ou du nombre de leucocytes, est associée à une augmentation du risque de MCV (Liuzzo et al., 1994; Altman, Rouvier, Scazziota, & Gonzalez, 2002; Blake & Ridker, 2001; Libby, Ridker, & Maseri, 2002; Wu et al., 2003). L'inflammation chronique sous-clinique a émergé au cours des dernières années comme un nouveau facteur de risque du développement du diabète de type 2 et comme le chaînon manquant, liant le diabète de type 2 et l'athérosclérose. Des études démontrant que des marqueurs d'inflammation sous-clinique, particulièrement la CRP et l'IL-6, sont de puissants prédicteurs indépendants de ces deux pathologies, supportent fortement cette

hypothèse (Pradhan et al., 2001; Festa et al., 2002; Ridker, Rifai, Stampfer, & Hennekens, 2000).

### **I.2.8 L'inflammation : le chaînon manquant reliant l'IR, l'obésité, le diabète de type 2 et l'athérosclérose.**

Les patients diabétiques de type 2 sont souvent insulino-résistants et souffrent d'obésité. De plus les sujets diabétiques de type 2 ont un risque accru de développer des MCV. Au cours des dernières années, l'inflammation systémique a émergé comme le chaînon manquant reliant ces différentes pathologies.

#### **I.2.8.1 Inflammation et obésité**

De nombreuses études ont démontré que les individus obèses présentent une augmentation des concentrations sériques de marqueurs inflammatoires, plus précisément de CRP, de  $TNF\alpha$  et d'IL-6 (Dandona et al., 1998; Dandona, Aljada, & Bandyopadhyay, 2004; Kern, Ranganathan, Li, Wood, & Ranganathan, 2001; Pradhan et al., 2001). De nombreuses évidences suggèrent que l'excès énergétique et en macronutriments, associés à l'obésité, pourraient tous deux activer des voies de signalisation pro-inflammatoires au niveau cellulaire. À cet effet, des études in vitro ont démontré que le glucose et les lipides pouvaient induire l'inflammation via l'augmentation des niveaux de stress oxydatif et l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 dans les monocytes (Mohanty et al., 2002; Dhindsa et al., 2004; Aljada et al., 2004). L'infusion

intraveineuse de lipides chez des individus normaux visant à élever leur concentrations en AGL afin d'atteindre celles observées chez des individus obèses, induit aussi une importante réponse inflammatoire (Tripathy et al., 2003) tandis qu'une restriction calorique chez ces individus réduit le stress oxydatif et diminue les concentrations des marqueurs inflammatoires (Dandona et al., 2001).

L'obésité est associée à une accumulation de lipides dans les adipocytes. Ces adipocytes hypertrophiés sont la source de molécules pro-inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$ , l'IL-6, la résistine, le MCP-1 et le PAI-1 (Shoelson, Herrero, & Naaz, 2007). Ces adipocytokines exercent un effet délétère au niveau du tissu adipeux, notamment au niveau des cellules endothéliales, en augmentant l'expression de molécules d'adhésion et la perméabilité vasculaire. Certaines contribuent aussi au recrutement des monocytes dans le tissu adipeux. L'infiltration macrophagique du tissu adipeux obèse contribue à y maintenir un état d'inflammation local dont les conséquences se traduisent par le développement d'une IR locale et systémique (Shoelson et al., 2007; Xu et al., 2003). L'hypothèse selon laquelle les adipocytes hypertrophiés initient le signal inflammatoire dans le tissu adipeux et que les macrophages résidents amplifient ce signal prévaut actuellement dans la littérature scientifique.

### **I.2.8.2 Inflammation et IR**

Les macrophages sont responsables de la majorité des cytokines pro-inflammatoires produites par le tissu adipeux obèse, incluant le  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-6 (Fried et al., 1998; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). De manière intéressante, il a été observé que l'augmentation d'expression de gènes liés à l'inflammation par les macrophages du tissu adipeux, précédait une augmentation dramatique de la production d'insuline (Xu et al., 2003) et que la sécrétion de cytokines par les macrophages, in vitro, était associée à l'IR adipocytaire (Zeyda et al., 2007). Une association entre les concentrations plasmatiques d'IL-6 et de CRP et l'IR est aussi documentée chez les sujets diabétiques (Muller et al., 2002; Pickup, Mattock, Chusney, & Burt, 1997).

De toutes les cytokines pro-inflammatoires dont les concentrations sont élevées chez les individus obèses, le  $\text{TNF}\alpha$  est celle qui serait impliquée de manière la plus importante dans l'IR. Son expression est fortement associée à une diminution du potentiel insulino-dépendant de captation du glucose par les tissus périphériques (Katsuki et al., 1998; Mishima et al., 2001) et l'infusion aiguë de  $\text{TNF}\alpha$  à des sujets sains inhibe cette dernière (Plomgaard et al., 2005). De plus, l'ablation du gène du  $\text{TNF}\alpha$  ou l'inhibition de la signalisation de celui-ci, rétablit la sensibilité à l'insuline des muscles squelettiques (Uysal, Wiesbrock, Marino, & Hotamisligil, 1997). Le  $\text{TNF}\alpha$  peut interférer avec l'action de l'insuline en altérant sa signalisation. Cette cytokine agit probablement via la JNK qui en ciblant le site de phosphorylation en sérine ser-307 sur le récepteur IRS-1, inactive celui-ci

(Aguirre, Uchida, Yenush, Davis, & White, 2000). Le  $\text{TNF}\alpha$ , en supprimant la signalisation de l'insuline, interfère aussi avec les effets anti-inflammatoires de cette hormone (Rana, Nieuwdorp, Jukema, & Kastelein, 2007).

Chez les obèses, les macrophages se trouvent dans un état inflammatoire caractérisé par une augmentation de l'activité de NF-kB, une diminution de son inhibiteur  $\text{IKK}\beta$  et une augmentation de la transcription de  $\text{TNF}\alpha$ . De récentes études suggèrent que l'augmentation des AGL serait responsable de cet état inflammatoire. Les AGL sont, rappelons le, augmentés chez les obèses et dans le syndrome métabolique (Ghanim et al., 2004) et leur infusion chez des humains, augmente de 1200 fois les niveaux circulants de  $\text{TNF}\alpha$  (Itani et al., 2002). Il a tout récemment été démontré, in vivo, que le  $\text{TNF}\alpha$  diminuait l'activité de l'AMPK, un important régulateur du métabolisme énergétique ainsi que de l'oxydation des acides gras. Cette diminution d'activité de l'AMPK produit une accumulation lipidique intramusculaire, entraînant une résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques (Steinberg, 2007). Ajoutons que cette diminution de l'oxydation des acides gras engendre une élévation subséquente d'AGL et de  $\text{TNF}\alpha$ , créant un cercle vicieux où l'IR se détériore.

### **1.2.8.3 Inflammation et diabète de type 2**

De nombreuses études appuient l'importance de l'inflammation chronique sous-clinique dans la pathogenèse du diabète de type 2. Le diabète de type 2 est une condition inflammatoire caractérisée par l'élévation de nombreux médiateurs

de l'inflammation tels l'acide sialique (Pickup et al., 1997), le nombre de globules blancs (Schmidt et al., 1999), la CRP, l'IL-6 (Pradhan et al., 2001) et le PAI-1 (Festa et al., 2002). Récemment, il a été démontré qu'une diminution des concentrations d'adiponectine (Snijder et al., 2006) ou une augmentation de celles d'IL-18 (Thorand et al., 2005), d'IL-8, de la protéine-10 induite par IFN- $\gamma$  (IP-10), de CRP et de MCP-1 (Herder et al., 2006) prédisait le développement du diabète de type 2. Il existe de plus une multitude d'essais cliniques ainsi que d'études in vitro ayant clairement démontré que les TZDs, des médicaments utilisés dans le traitement du diabète de type 2 qui augmentent la sensibilité à l'insuline en se liant au récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases gamma (PPAR- $\gamma$ ), exercent de puissants effets anti-inflammatoires et anti-athérosclérotiques (Libby & Plutzky, 2007). Ces effets anti-inflammatoires comportent notamment la diminution de l'expression des molécules d'adhésion, la réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) et l'inhibition de l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B (Libby et al., 2007). Notons toutefois que les résultats des premières études cliniques sur la réduction par les TZD de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire, bien qu'ils soient prometteurs, ne sont pas concluants (Kelly & Bank, 2007). Ceci semblerait être attribuable aux récentes données rapportant une augmentation du risque de défaillance cardiaque chez les sujets diaéétiques de type 2 traités aux TZD (Erdmann & Wilcox, 2008).

La forte association entre l'IR, l'inflammation et le diabète de type 2 suggère donc que l'association entre l'inflammation et le diabète de type 2 soit due à l'IR.

#### **I.2.8.4 Inflammation et athérosclérose**

L'initiation de l'athérosclérose commence par des changements de nature inflammatoire au niveau de l'endothélium où l'on observe une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1. Cette dernière recrute les monocytes qui migrent alors à travers l'endothélium sous l'influence de diverses molécules chémoattractrices pro-inflammatoires incluant les LDLox. Une fois dans l'intima, les monocytes se transforment en macrophages qui engouffrent des lipides et deviennent des cellules spumeuses. Les lymphocytes T migrent également dans l'intima, libérant des cytokines pro-inflammatoires qui amplifient la réponse inflammatoire locale. Ces événements inflammatoires mènent à la lésion initiale de l'athérosclérose, la strie lipidique. L'inflammation est également centrale à la progression de la strie lipidique vers la lésion avancée. Au cours de cette progression, les cellules T activent les macrophages qui sécrètent une large panoplie de molécules, incluant des cytokines et des métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui participent à la dégradation du collagène formant la coiffe fibreuse. Ce milieu inflammatoire rend la coiffe fibreuse mince, friable et plus susceptible à la rupture. La rupture de la plaque mène à la formation d'un thrombus causant l'infarctus et autres complications associées (Libby, 2006).

L'inflammation joue donc un rôle central dans l'athérosclérose, tel qu'illustré à la Figure 6. Elle est impliquée dans toutes les phases de celle-ci, depuis son initiation, en passant par son développement, jusqu'à son dénouement ultime, la rupture de la plaque.

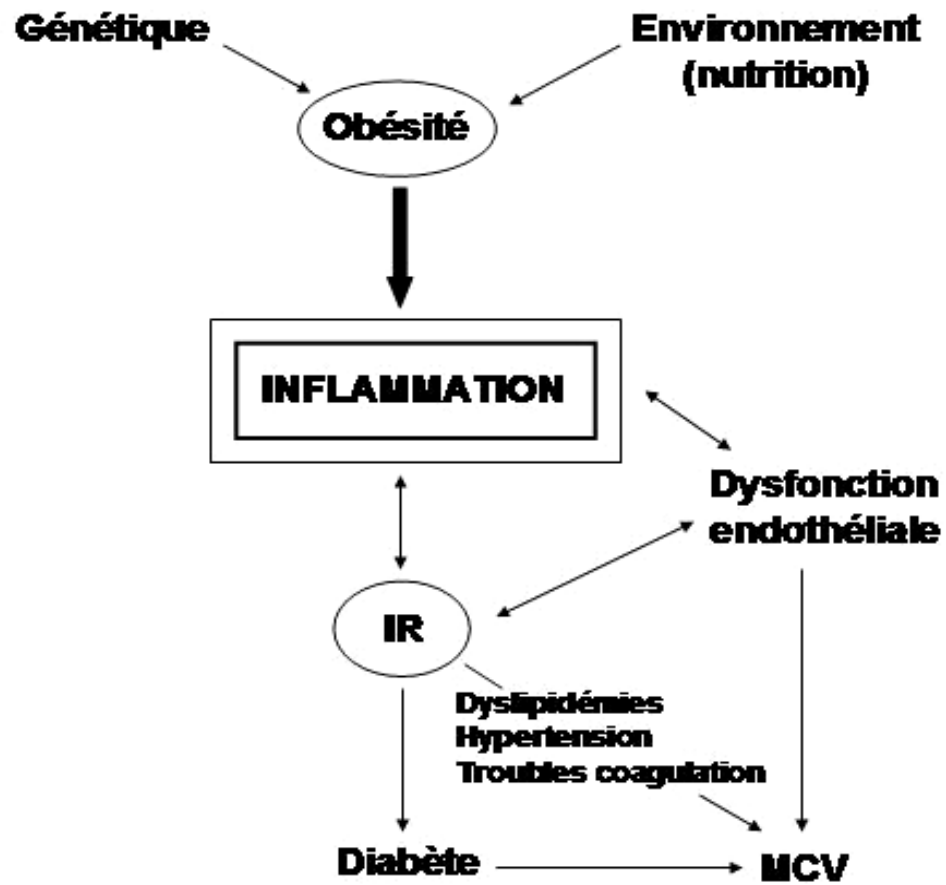


Figure 6. L'inflammation : le chaînon manquant reliant l'IR, l'obésité, le diabète de type 2 et l'athérosclérose.



### **I.3 Lipoprotéine lipase (LPL)**

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 circulants. Les acides gras générés par cette action sont captés par les tissus périphériques incluant les muscles et le tissu adipeux. Le muscle oxyde les acides gras générés par la LPL pour fournir de l'énergie tandis que le tissu adipeux réestérifie ces acides gras pour le stockage énergétique. La LPL stimule également, indépendamment de son activité lipolytique la liaison et la captation cellulaire des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL, HDL). Cette fonction de pont moléculaire est exercée via la liaison simultanée de la LPL aux protéoglycans exprimés à la surface de la cellule, aux lipoprotéines et à divers récepteurs de la LPL tels que la protéine reliée au récepteur aux LDL (LRP), le récepteur aux LDL, le récepteur aux VLDL, le GP330 et le SR-B1.

#### **I.3.1 Structure 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 & 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.

Plus de 100 mutations du gène de la LPL ont jusqu'à ce jour été répertoriées. La fréquence de mutations de la LPL chez des individus, diffère largement entre les populations. Les canadiens français présentent par exemple un taux particulièrement élevé de mutations de la LPL (Pro207Leu, Gly188Glu et Asp250An), soit 17% (Minnich et al., 1995). Certaines mutations résultent en une perte totale de la fonction de la LPL tandis que d'autres, comme la D9N, N29IS ET S447X, n'exercent qu'un effet modéré sur l'activité de la LPL (Nierman et al., 2005). Les porteurs de la mutation N29IS et D9N, dont la fréquence combinée est de 5% dans la population générale, présentent de faibles concentrations de cholestérol HDL, une augmentation de leurs TG et une augmentation du risque de MCV (Wittrup, Tybjaerg-Hansen, & Nordestgaard, 1999; van Bockxmeer, Liu, Mamotte, Burke, & Taylor, 2001). Chez les porteurs de la mutation S447X, dont la fréquence est quant à elle de 18 à 22% dans la population générale, on observe par contre une augmentation des concentrations de cholestérol HDL et une diminution des concentrations sériques de TG. Cette mutation exerce un effet protecteur contre les MCV (Rip et al., 2006a).

### I.3.1.1 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 : 1) d'une boîte TATA où se lie le facteur de transcription IIB, nécessaire à l'initiation de la transcription; 2) d'un motif octamer, où se lient le Oct-1 et Oct-2; et 3) 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. (Enerback et al., 1993) a démontré que les motifs lipoprotéines  $\alpha$  et  $\beta$  (Lp $\alpha$  et Lp $\beta$ ) se lient au facteur nucléaire-3 (NF-3). Cette interaction contribue à la différenciation durant l'adipogénèse. La différenciation est donc dépendante de l'activité du promoteur. Un élément CT (5'-cctcccccc-3') affecte l'activité basale du promoteur de la LPL par la liaison de protéines de spécificité (Sp) 1 et/ou 3 à ce site, deux facteurs de transcription contenant trois motifs à doigts de zinc. Chevauchant l'élément CT, l'élément régulé par les stéroïdes (SRE) est responsable de la réponse de la LPL aux stéroïdes. La protéine de liaison à l'élément de régulation des stéroïdes-1 (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 TG s'autorégulent. Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 se lient aussi à l'élément de réponse de l'IFN- $\gamma$ . En effet, lorsque les macrophages

sont mis en présence d'IFN- $\gamma$ , 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. 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 récepteur hépatique X (LXR) 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, Repa, Gauthier, & Mangelsdorf, 2001). 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 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 al., 1993; Sartippour, Lambert, Laframboise, St-Jacques, & Renier, 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>                                   |
|----------------------------|---|
| ATTTGCAT                   | -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   |
| IFN- $\gamma$ 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 al., 1993; Mead, Irvine, & Ramji, 2002a; Merkel et al., 1998; Preiss-Landl, Zimmermann, Hammerle, & Zechner, 2002)

### 1.3.1.2 Régulation post-transcriptionnelle de la LPL

La régulation post-transcriptionnelle constitue le principal mécanisme de régulation de l'expression de la LPL. Le statut nutritionnel, l'insuline, l'adrénaline et l'hormone thyroïdienne régulent tous l'expression de la LPL à ce niveau (Doolittle, Ben-Zeev, Elovson, Martin, & Kirchgessner, 1990; Enerback et al., 1993; Kern, Ranganathan, Yukht, Ong, & Davis, 1996; Ranganathan, Vu, & Kern, 1997; Semenkovich, Wims, Noe, Etienne, & Chan, 1989). La régulation post-transcriptionnelle, dépendamment des facteurs impliqués, peut s'exercer à différents niveaux incluant : la stabilité de l'ARNm, la dégradation protéique, la

maturation, la sécrétion, la translocation au site d'action et l'inhibition compétitrice par certains produits. Par exemple, l'insuline augmente les niveaux d'ARNm de la LPL dans les adipocytes, sans affecter le taux de transcription du gène, suggérant un contrôle au niveau de la stabilité du messager (Semenkovich et al., 1989) tandis que les acides gras non-estérifiés (AGNE), à concentrations élevées, compétitionnent avec la LPL pour la liaison aux HSPG, menant ainsi à la libération de la LPL liée à la surface des cellules endothéliales (Saxena, Witte, & Goldberg, 1989). Il est fort probable que toute l'étendue des différents niveaux de contrôle post-transcriptionnel soit utilisée pour la régulation complexe de la LPL.

### **I.3.2 Structure de la protéine**

#### **I.3.2.1 Synthèse et maturation**

La LPL est composée de 448 acides aminés (Mead et al., 2002a). La traduction à partir de l'ARNm de la LPL s'effectue dans le 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., 2002a). 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 (Hoogewerf, Cisar, Evans, & Bensadoun, 1991). 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 plasmique.

### **I.3.2.2 Structure homodimérique**

La lipase pancréatique a été cristallisée, permettant l'élaboration d'un modèle tridimensionnel de la LPL (van, Roussel, Lalouel, & Cambillau, 1994). Celui-ci a permis d'établir que la LPL est organisée en deux régions structurellement distinctes : un domaine amino-terminal plus grand (résidus 1-312) et un plus petit domaine carboxy-terminal (résidus 313-448), connectés par un peptide flexible. Le domaine C-terminal est nécessaire pour la liaison au substrat tandis que le domaine N-terminal est responsable de l'activité catalytique de la protéine. L'homodimérisation de la LPL est nécessaire à son activité lipolytique ainsi qu'à sa liaison aux héparans sulfate. La structure homodimérique constitue donc la forme active de la LPL et sa dissociation mène à une inactivation irréversible de l'enzyme (Osborne, Jr., Bengtsson-Olivecrona, Lee, & Olivecrona, 1985).

### I.3.2.3 Site catalytique

L'alignement de séquences entre la LPL et la lipase pancréatique a permis de déterminer que la triade catalytique homologue de la LPL humaine correspond à Ser132-Asp156-His241 (Winkler, D'Arcy, & Hunziker, 1990; Blow, 1990). Cette triade active fut confirmée chez des patients ayant une déficience en LPL ainsi que par mutagenèse dirigée contre le site. Cette triade catalytique (Ser132-Asp156-His241) bien conservée est située dans un sillon en plein cœur du dimère de la LPL et est protégée par une structure boucle/couvercle (résidus 216~239) (van et al., 1994). Cette boucle de surface contrôle l'activité de la LPL en changeant sa conformation entre les formes ouverte et fermée, correspondant respectivement aux formes active et inactive de la LPL. La forme ouverte, contrairement à la forme fermée, étire la boucle de surface et expose le sillon, contenant la triade catalytique, rendant celui-ci plus accessible aux substrats. Un motif hélice-tour-hélice est nécessaire à la liaison du substrat et à l'hydrolyse. La suppression partielle ou la mutation de la section médiane/apicale de la boucle préserve une activité lipolytique normale. Par contre, la mutation de la section proximale de la boucle entraîne une déficience en LPL, suggérant que les parties proximale et distale de la boucle soient critiques pour l'hydrolyse du substrat (Henderson et al., 1993).

L'apo CII est un cofacteur de la LPL, activant celle-ci après s'y être lié (Bengtsson & Olivecrona, 1982). Une région spécifique de la LPL interagit avec l'apo CII au niveau des résidus 65-86 du domaine N-terminal. (McIlhargey, Yang, Wong, & Hill, 2003). Un autre domaine essentiel pour la liaison à la LPL a



également été identifié au niveau C-terminal de l'apo CII (Cheng, Blackett, Jackson, McConathy, & Wang, 1990).

#### **I.3.2.4 Site de liaison lipidique**

Le domaine C-terminal de la LPL étant hydrophobe, il interagit avec les lipides hydrophobes. Le rôle critique du domaine C-terminal dans la liaison des lipides est démontré par l'observation que l'ablation de l'extrémité C-terminale induit une perte de liaison de la LPL aux chylomicrons (Lookene & Olivecrona, 1993). Le site de liaison lipidique a été identifié comme étant un regroupement de tryptophanes (Trp390-Trp393-Trp394) dans le domaine C-terminal (Lookene et al., 1993). L'interaction de la LPL avec les lipoprotéines comme les chylomicrons et les VLDL implique des forces électrostatiques et hydrophobes. L'hypothèse la plus acceptée jusqu'à maintenant est que la LPL interagit avec les apolipoprotéines à la surface des lipoprotéines. Ce fait est cependant remis en cause par plusieurs observations suggérant que la LPL se lierait plutôt au phospholipides (Boren et al., 2001). Cette dernière hypothèse s'appuie sur la démonstration que la liaison de la LPL aux lipoprotéines se produit même en absence d'apoB100 et que la délipidation des LDL diminue de façon significative leur liaison à la LPL tandis que des liposomes contenant de la phosphatidylcholine compétitionnent avec les LDL pour la liaison à la LPL (Boren et al., 2001).

### **I.3.2.5 Site de liaison à l'héparine**

La LPL possède la capacité de lier l'héparine. À la surface des cellules endothéliales, un protéoglycan héparan-sulfate de 220-kDa a été identifié comme récepteur pour la LPL (Saxena, Klein, & Goldberg, 1991). Quatre sites pour la liaison aux héparan-sulfate ont été identifiés au niveau des résidus 279-282 et 292-304 du domaine N-terminal et au niveau des résidus Lys-319, Lys-403, Arg-405, Lys-407 et Lys-413-414 du domaine C-terminal. Des mutations au niveau de ces regroupements diminuent significativement l'affinité de la LPL pour l'héparine (Ma et al., 1994; Berryman & Bensadoun, 1993), suggérant donc un rôle de ces domaines dans la liaison à l'héparine (Sendak & Bensadoun, 1998).

### **I.3.2.6 Site de liaison aux récepteurs**

La LPL peut également lier divers récepteurs de lipoprotéines, incluant le récepteur aux LDL, le LRP et le GP330, un membre de la famille des récepteurs aux LDL. La liaison de la LPL au LRP a par exemple été démontrée par l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre le LRP capable de bloquer la dégradation cellulaire de la LPL de façon dose-dépendante (Chappell, Fry, Waknitz, & Berns, 1992). Une forte affinité de la LPL pour le récepteur aux VLDL a également été démontrée dans des expériences de liaison in vitro (Argraves et al., 1995). Les sites de liaison pour les récepteurs cellulaires de surface ont été confirmés comme étant présents sur le domaine C-terminal de la LPL. Une récente étude de Page et coll. (Page, Judson, Melford, & Bensadoun, 2006) laisse de plus suggérer que la protéine associée au récepteur (RAP), une protéine

chaperone, se lierait avec une forte affinité à la LPL et jouerait un rôle dans la maturation de la LPL en prévenant l'interaction prématurée de la LPL au LRP et aux héparans sulfate.

### **1.3.2.7 Rôle de la LPL dans le métabolisme des lipides**

Les chylomicrons et les VLDL transportent physiologiquement la quasi-totalité des TG. Les AGL produits par l'hydrolyse des TG sont soit captés par les cellules, soit liés à l'albumine et transportés vers le foie. Le catabolisme des particules riches en TG par la LPL s'accompagne d'un transfert important de lipides. En appauvrissant la particule en TG, la LPL diminue la taille de la lipoprotéine et rend disponible les lipides de surface (phospholipides), pour la formation des HDL naissantes. L'action de la LPL s'accompagne d'un transfert de TG et de cholestérol entre les HDL, les VLDL et les chylomicrons (Wang, Hartsuck, & McConathy, 1992) Après hydrolyse des lipoprotéines riches en TG, la LPL reste associée sous sa forme dimérique aux résidus de ces lipoprotéines et médie, en stimulant la liaison et la captation cellulaire des lipoprotéines, leur catabolisme (Cryer, 1981). Par son activité catalytique, la LPL joue un rôle dans le métabolisme énergétique et glucidique, aspects qui seront développés dans les prochaines sections.

La LPL stimule le catabolisme des LDL et surtout des VLDL via le récepteur des LDL (Chappell & Medh, 1998). Le LRP induit la captation, médiée par la LPL, des chylomicrons, des VLDL et des  $\beta$ -VLDL (Beisiegel & Heeren, 1997). Le

récepteur GP330 paraît faciliter la clairance des lipoprotéines associées à la LPL dans le plasma (Kounnas, Chappell, Strickland, & Argraves, 1993). Finalement, le récepteur VLDL, exprimé au niveau musculaire, adipeux et cardiaque, augmente la captation des VLDL médiée par la LPL (Argraves et al., 1995). Au niveau des fibroblastes, la LPL induit le catabolisme des lipoprotéines riches en TG via la protéine reliée au LRP, les protéoglycans de la surface cellulaire facilitant ce processus (Chappell et al., 1993). La LPL augmente la liaison et l'association cellulaire des LDL natives et oxydées aux macrophages et contribue à la formation des cellules spumeuses (Ross, 1999). La LPL médie aussi la captation des HDL par les cellules hépatiques, indépendamment de son activité lipolytique et indépendamment de la présence de récepteurs aux LDL (Rinninger et al., 1998).

Si le rôle majeur de la LPL est d'hydrolyser les lipoprotéines riches en TG, la finalité de son action varie selon les tissus. Ainsi, l'enzyme assure la production de lait dans la glande mammaire, la mise en réserve de graisse dans le tissu adipeux, l'approvisionnement en énergie pour le muscle, la synthèse de surfactant dans les cellules pulmonaires et enfin la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Mead et al., 2002a).

### **I.3.3 Régulation de l'expression de la LPL**

#### **I.3.3.1 Expression tissulaire de la LPL**

La régulation de la LPL est tissu spécifique. La LPL jouant un rôle clé dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG, elle est exprimée de façon prépondérante dans le tissu adipeux et musculaire où les AGL dérivés de l'hydrolyse des TG par la LPL sont soit activement utilisés pour l'entreposage d'énergie par réestérification soit subissent une oxydation pour fournir de l'énergie. La glande mammaire est une autre source importante de LPL ; l'enzyme synthétisée est sécrétée en association avec les gouttelettes lipidiques du lait (Camps, Reina, Llobera, Vilario, & Olivecrona, 1990). La LPL a également été détectée dans les CML des grosses artères (Yla-Herttuala et al., 1991). Bien que les cellules endothéliales ne soient pas une source importante de production de LPL, cette dernière est synthétisée par les cellules parenchymateuses et transférée à la surface de l'endothélium (Camps et al., 1990). Les macrophages activés produisent de fortes quantités de LPL, jouant un rôle primordial dans le développement de l'athérosclérose (Babaev et al., 1999). L'expression de LPL a également été observée dans les surrénales, ovaires, testicules, poumons, foie, cerveau, reins et rate mais le rôle de la LPL dans ces tissus n'a pas encore été bien caractérisé (Braun & Severson, 1992b). Après sécrétion, la LPL se lie aux HSPG ou à de petits protéoglycans extracellulaires se trouvant dans la matrice sous-endothéliale.

### **I.3.3.2 Régulateurs physiologiques de la LPL**

#### **I.3.3.2.1 Jeûne, état post-prandial et activité physique**

La LPL du tissu adipeux et la LPL musculaire sont régulées de manière opposée en phase post-prandiale et au cours du jeûne. Au cours du jeûne, une activité élevée de la LPL musculaire et basse de la LPL adipeuse, dirige les TG vers les muscles qui les utilisent comme substrats énergétiques. Au contraire, en phase post-prandiale, l'activité de la LPL augmente dans le tissu adipeux, assurant ainsi une mise en réserve des graisses dans ce tissu. Ces différences dans le niveau d'activité de la LPL reflètent les besoins énergétiques de l'organisme. Effectivement, le tissu adipeux stocke les graisses à l'état post-prandial, période pendant laquelle le muscle cardiaque utilise le glucose comme principale source d'énergie. En période de jeûne, il se produit une lipolyse des TG dans le tissu adipeux pour fournir l'énergie nécessaire à l'organisme (Eckel, 1989; Olivecrona, Bergo, Hultin, & Olivecrona, 1995).

Plusieurs études ont démontré une régulation nutritionnelle de la LPL plasmatique. Dans des modèles animaux, il a récemment été démontré que le glucose diminuait l'activité de la LPL plasmatique (Jindrichova, Kratochvilova, & Kovar, 2007) tandis qu'une diète riche en acides gras saturés ou monoinsaturés, augmentait la LPL plasmatique (Van & Zilvermit, 1990). Chez l'humain, Coppack et coll. (Coppack, Yost, Fisher, Eckel, & Miles, 1996) ont rapporté que le muscle sécrète la LPL active dans le plasma à l'état post-prandial mais aucune LPL active à l'état de jeûne. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où l'activité de la

LPL est généralement plus élevée dans le tissu adipeux que dans le tissu musculaire. Karpe et coll. (Karpe et al., 1998) ont observé par ailleurs qu'à l'état post-prandial et à l'état de jeûne, les tissus adipeux et musculaire sécrètent tous deux la LPL dans le plasma. Cependant, alors que le tissu musculaire sécrète régulièrement de la LPL active dans le plasma, le tissu adipeux sécrète une quantité importante de LPL inactive (Bergo, Olivecrona, & Olivecrona, 1996). Il semble que la LPL active soit redistribuée du tissu musculaire vers le tissu adipeux.

Suite à un exercice physique, la LPL musculaire augmente, favorisant l'utilisation énergétique. On a d'ailleurs pu démontrer que chez des athlètes ayant cessé de s'entraîner pendant une période de 2 semaines, il y a diminution de la LPL musculaire et une augmentation de la LPL adipocytaire (Simsolo, Ong, & Kern, 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, Wooding, Lambert, Koeslag, & Noakes, 1994). Il a de plus été récemment démontré que l'inactivité physique amplifie l'inhibition de l'activité de la LPL du muscle squelettique induite par les lipides plasmatiques (Zderic & Hamilton, 2006).

### **I.3.3.2.2 Régulation hormonale**

#### **I.3.3.2.2.1 Stéroïdes**

Les glucocorticoïdes (hydrocortisone, dexaméthasone) ont un effet adipogénique dans les pré-adipocytes humains et murins et celui-ci est accompagné d'une augmentation des niveaux d'ARNm de la LPL adipocytaire et de son activité enzymatique. Des effets similaires sont observés dans une lignée de cellules leucémiques monocytaires humaines, les cellules THP-1 (Auwerx, Deeb, Brunzell, Peng, & Chait, 1988; Domin, Chait, & Deeb, 1991). L'effet des glucocorticoïdes *in vivo* est moins clair. Leur administration à des rats augmente l'activité enzymatique de la LPL dans le poumon (Hamosh, Yeager, Jr., Shechter, & Hamosh, 1976), le muscle squelettique et le cœur (Krausz, Bar-On, & Shafrir, 1981) mais la diminue dans le tissu adipeux (Ong, Simsolo, Saffari, & Kern, 1992). Par contre, dans le tissu adipeux de rats mis à jeun pendant 24 h, les glucocorticoïdes causent une augmentation de l'activité enzymatique de la LPL (Ashby & Robinson, 1980).

#### **I.3.3.2.2.2 Insuline**

L'insuline est l'hormone régulatrice majeure de la LPL adipocytaire. Des études menées sur des adipocytes isolés et en culture ont démontré que cette hormone inhibe la lipolyse, mais augmente, de manière aiguë, l'activité de la LPL et sa sécrétion; cette augmentation est attribuée à des effets post-transcriptionnels



de l'insuline sur les niveaux de la LPL adipocytaire (Eckel & Yost, 1987; Picard, Naimi, Richard, & Deshaies, 1999; Semenkovich et al., 1989). Des études *in vitro* ont montré que l'exposition des adipocytes 3T3-L1 à l'insuline cause la relâche de la LPL dans le milieu extracellulaire (Spooner, Chernick, Garrison, & Scow, 1979b). La phosphatidyl-inositol-phospholipase C paraît être impliquée dans l'effet de l'insuline sur la libération de la LPL (Chan, Lisanti, Rodriguez-Boulan, & Saltiel, 1988).

*In vivo*, une réduction de la LPL adipocytaire a été documentée chez le rat diabétique. Cette altération est réversible par administration d'insuline (Deshaies, Geloën, Paulin, & Bukowiecki, 1991). L'activité de la LPL adipocytaire est aussi élevée durant le clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez l'homme et le rat (Terrettaz, Cusin, Etienne, & Jeanrenaud, 1994). Cette augmentation semble médiée par la PI-3K (Kraemer, Takeda, Natu, & Sztalryd, 1998). Si l'activation de la PKC n'augmente pas la LPL adipocytaire, son inhibition entraîne par contre une diminution de la synthèse de l'enzyme, suggérant un rôle constitutif de la PKC dans la régulation de la LPL adipocytaire (Ranganathan, Kaakaji, & Kern, 1999). Outre l'insuline, le glucose augmente aussi *in vitro* l'activité et la synthèse de la LPL par les adipocytes en culture. Il potentialise les effets stimulants de l'insuline sur l'activité de la LPL adipocytaire (Ong & Kern, 1989b).

Les effets modulateurs de l'insuline sur l'activité de la LPL musculaire sont moins bien caractérisés. L'insuline inhibe l'activité et l'expression génique de la LPL musculaire (Laville et al., 1996). Cette inhibition est inversement reliée à la

captation musculaire de glucose (Kiens, Lithell, Mikines, & Richter, 1989). La diminution aigüe de l'insulinémie durant le jeûne et l'exercice physique est accompagnée d'une augmentation de l'activité musculaire de l'enzyme (Seip, Angelopoulos, & Semenkovich, 1995). Par contre, une diminution chronique de l'insuline diminue les niveaux de LPL musculaire, suggérant que le maintien des niveaux physiologiques de LPL musculaire nécessite la présence continue de cette hormone (Deshaies et al., 1991). Une étude a suggéré que les niveaux d'activité de la LPL musculaire pourraient être reliés à l'action métabolique de l'insuline sur la captation de glucose et sur le métabolisme des lipides, plutôt qu'à ses taux plasmatiques (Ferraro et al., 1993).

Au niveau cardiaque, l'insuline semble diminuer l'activité de la LPL par un effet indirect. En effet, si l'incubation des cardiomyocytes en présence d'insuline n'affecte pas l'activité de la LPL, l'injection d'insuline *in vivo* induit une diminution d'activité de la LPL cardiaque chez le rat (Braun & Severson, 1992a).

L'insuline participe aussi au contrôle transcriptionnel de la LPL dans les glandes mammaires. Ainsi, l'infusion d'insuline chez le rat augmente l'expression génique et l'activité de la LPL au niveau des glandes mammaires (Ramos, Martin-Hidalgo, & Herrera, 1999).

Le rôle de l'insuline dans la régulation de la LPL macrophagique n'a pas encore été élucidé. Kawakami et coll. (Kawakami, Murase, Ishibashi, Mori, & Takaku, 1986) n'ont pas observé d'effet de l'insuline sur l'expression de la LPL

macrophagique tandis qu'une autre étude a observé que l'insuline diminuait la sécrétion de LPL par des macrophages murins mais que l'effet était indirectement causé par des changements secondaires causés par la production d'effecteurs immunologiques dans le diabète (Behr & Kraemer, 1988).

#### **I.3.3.2.3 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 & Marcus, 2000; Takahashi & Satozawa, 2002), suggérant un rôle 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, Sassolas, Borson-Chazot, Vega, & Vidal, 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, Li, Maingrette, Jaffry, & Renier, 2004). Il a été rapporté que l'expression génique, la masse et l'activité de la LPL macrophagique sont augmentées chez des patients déficients en GH. Les macrophages isolés de

ces patients démontrent aussi une augmentation de la captation de lipoprotéines athérogènes 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.3.3.2.2.4 Thyroxine**

L'activité de la LPL du tissu adipeux brun est 100 fois plus élevée chez les rats ayant subi une thyroïdectomie que chez des rats contrôles (Hemon, Ricquier, & Mory, 1975). Dans le tissu adipeux blanc, l'activité et le taux de synthèse protéique de la LPL chez les rats hypothyroïdiens sont augmentés de 4.5 et 2.5 fois respectivement, comparativement aux rats contrôles (Saffari, Ong, & Kern, 1992). Finalement, dans le muscle cardiaque et les muscles à contraction lente, l'activité de la LPL chez des animaux hypothyroïdiens est augmentée de 5 et 10 fois respectivement, comparativement aux animaux contrôles, sans changement au niveau du taux de synthèse protéique et des niveaux d'ARNm (Ong, Simsolo, Saghizadeh, Pauer, & Kern, 1994). Finalement, la thyroxine stimule la synthèse et l'activité de la LPL macrophagique (Saffari et al., 1992). L'ensemble de ces résultats suggère que la régulation de la LPL par les hormones thyroïdiennes s'effectue principalement au niveau post-transcriptionnel.

#### **I.3.3.2.2.5 Prolactine**

In vitro, la prolactine induit l'activité de la LPL et la différenciation des adipocytes dans la lignée cellulaire 3T3-L1 (Spooner, Chernick, Garrison, & Scow, 1979a). In vivo, l'activité de la LPL dans le tissu mammaire de cochons d'Inde est augmentée de 100 fois par rapport aux niveaux de base, 48 h pré-partum, augmentation maintenue tant que la mère allaite ses bébés (Robinson, 1963).

#### **I.3.3.2.2.6 Catécholamines**

La libération de catécholamines, telle que celle observée lors de l'exposition au froid, induit une diminution de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux blanc (Radomski & Orme, 1971) et son augmentation dans le tissu adipeux brun (Obregon et al., 1989) et le muscle cardiaque (Friedman et al., 1986). L'injection de norépinéphrine reproduit ces effets in vivo (Carneheim, Nedergaard, & Cannon, 1984). L'exposition du tissu adipeux à l'adrénaline entraîne une rapide inactivation de l'activité enzymatique de la LPL (Ashby, Bennett, Spencer, & Robinson, 1978), vraisemblablement via des mécanismes post-transcriptionnels (Chernick, Spooner, Garrison, & Scow, 1986).

#### **I.3.3.2.2.7 Hormones sexuelles**

Les hormones sexuelles telles que la testostérone et les oestrogènes peuvent influencer l'expression de la LPL. À cet effet, une corrélation négative est observée entre les niveaux d'oestrogènes et l'activité de la LPL adipocytaire chez les femmes obèses préménopausées (Iverius & 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 (séquence TGAATTC *AP-1-like*) de réponse aux oestrogènes dans le promoteur du gène de la LPL a été caractérisé (Homma et al., 2000). Jusqu'à ce jour, une seule étude a évalué l'effet des oestrogènes sur l'activité de la LPL macrophagique (Napolitano, Blotta, Montali, & Bravo, 2001). Cette étude a démontré que les oestrogènes augmentaient l'activité de la LPL par les macrophages.

Chez l'homme, la testostérone diminue l'activité de la LPL adipocytaire, surtout au niveau du tissu adipeux viscéral (De, 2000; Marin, 1995). La diminution des niveaux de testostérone avec l'âge pourrait contribuer à une augmentation de la LPL adipocytaire et conséquemment, au développement de l'obésité.

### **I.3.3.2.3 Régulation par les cytokines pro-inflammatoires**

#### **I.3.3.2.3.1 TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  inhibe l'activité de la LPL adipocytaire de manière dose- et temps-dépendant in vitro (Price, Olivecrona, & Pekala, 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, Hughes, Cryer, & Ramji, 1996). La suppression de l'activité de la LPL était plus importante quand l'interleukine-11 (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' $IFN-\gamma$  et de  $TNF-\alpha$ , l'effet étant maximal lors de leur combinaison (Tengku-Muhammad, Cryer, & Ramji, 1998).

#### **I.3.3.2.3.2 $IFN-\gamma$**

L' $IFN-\gamma$  inhibe l'activité de la LPL adipocytaire d'environ 80% (Enerback et al., 1993). Comme mentionné ci-haut, l' $IFN-\gamma$  synergise avec le  $TNF\alpha$  pour inhiber l'expression de la LPL adipocytaire. De manière similaire, un effet inhibiteur de l' $IFN-\gamma$  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.3.3.2.3.3 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 al., 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, Hughes, Cryer, & Ramji, 1999).

#### **I.3.3.2.3.4 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 al., 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.3.3.2.3.5 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, Chait, Klebanoff, Deeb, & Brunzell, 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, que 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., 2002a)

| <b>Agent régulateur</b>                     | <b>Type cellulaire/tissulaire</b>                     | <b>Effet sur la LPL</b> |
|---|---|-------------------------|
| 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      |
|   | Macrophages murins<br>dérivés de la moelle<br>osseuse | ↓ activité              |
| M-CSF                                       | Cellules cardiaques de rat                            | ↓ 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<br>péritonéaux                     | ↓ mRNA, ↓ activité      |
|   | J774.2  | ↑ mRNA, ↑ activité      |
| Intermédiaires des<br>radicalaires oxygénés | Cellules cardiaques de rat                            | ↓ mRNA, ↓ activité      |
| TGF- $\beta$                                | 3T3-F442A   | ↓ mRNA, ↓ activité      |
| TNF- $\alpha$                               | 3T3-L1  | ↓ mRNA, ↓ activité      |
|   | Adipocytes de rats                                    | ↓ mRNA, ↓ activité      |
|   | Macrophages murins<br>péritonéaux                     | ↓ activité              |
|   | J774.2  | ↓ mRNA, ↓ activité      |
|   | Cellules cardiaques de rat                            | ↓ activité              |

### **I.3.3.3 LPL et pathologies**

#### **I.3.3.3.1 LPL et obésité**

La LPL étant une enzyme clé dans l'emmagasinement des acides gras dans le tissu adipeux, il a été suggéré qu'un ratio LPL adipocytaire/musculaire élevé puisse être impliqué dans le développement de l'obésité. Cette hypothèse a été appuyée par les travaux de Kern et coll. (Kern, 1997) qui ont rapporté que les personnes obèses présentaient une augmentation de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux. De manière intrigante, lors de la perte pondérale, ces sujets présentaient une augmentation additionnelle de l'activité de la LPL adipocytaire probablement en raison d'une amélioration de leur état d'IR. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que la LPL adipocytaire puisse constituer un *"set point"* limitant la perte de graisse adipocytaire lors d'une diète hypocalorique. La possibilité qu'une élévation du ratio LPL adipocytaire/musculaire puisse jouer un rôle dans le développement de l'obésité a été supportée par des expériences chez des animaux obèses chez lesquels on a observé une augmentation de la LPL adipocytaire et une diminution de la LPL musculaire suite à l'administration d'une diète riche en gras (Mantha, Russell, Brindley, & Deshaies, 2002; Roberts, Barnard, Liang, & Vaziri, 2002). Cette hypothèse du *"vol de substrat"* a également été appuyée par une étude chez des souris transgéniques surexprimant la LPL dans le muscle squelettique. En effet, chez celles-ci, une surexpression de LPL musculaire a réussi à prévenir l'obésité induite par une diète riche en gras (Jensen et al., 1997). Koike et coll. (Koike et al., 2004) ont également démontré qu'une

surexpression systémique de la LPL chez des lapins transgéniques, exprimant d'avantage de LPL musculaire que de LPL adipocytaire, réduisait le développement de l'obésité. Parallèlement, il a été documenté que des souris génétiquement obèses (*ob/ob*) ou soumises à une diète riche en gras, résistaient au développement de l'obésité lorsqu'elles étaient porteuses d'une déficience en LPL adipocytaire (Preiss-Landl et al., 2002; Weinstock et al., 1997). Finalement, une récente étude de Kusunoki et coll. (Kusunoki et al., 2005) a démontré que l'administration de NO-1886 (ibrolipim), un activateur de la LPL dans le muscle squelettique, pouvait supprimer l'accumulation de graisses chez les rats dont l'obésité était induite par une diète riche en gras. Ces études démontrent bien l'importance que le ratio LPL adipocytaire/musculaire pourrait jouer dans le développement de l'obésité.

#### **I.3.3.3.2 LPL et IR**

Il a été observé chez l'animal qu'une surexpression de LPL au niveau musculaire induisait une élévation du contenu en TG dans le muscle et que celle-ci était associée à un état d'IR et à une réduction de la captation de glucose par le muscle (Ferreira, Pulawa, Jensen, & Eckel, 2001). De manière similaire, il a été démontré qu'une surexpression de la LPL au niveau hépatique induisait un état d'intolérance au glucose et une diminution de la suppression de la production hépatique de glucose (Kim et al., 2001b). La LPL est également exprimée par les cellules- $\beta$  du pancréas et il a été récemment démontré que chez des souris KO

chez lesquelles l'expression de la LPL par les cellules- $\beta$  pancréatiques est supprimée, il y avait diminution d'influx d'acides gras dans les îlots et diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Pappan et al., 2005), suggérant l'importance de la LPL et de la disponibilité en AGL pour la sécrétion d'insuline.

Des études animales utilisant des lapins transgéniques surexprimant la LPL ont aussi démontré qu'une surexpression de la LPL au niveau systémique était associée à une réduction de l'IR (Koike et al., 2004; Kitajima et al., 2004). Il a été postulé que cet effet puisse être attribuable à la réduction des niveaux d'AGL plasmatiques due à l'utilisation de ces substrats par le muscle ou par le foie. Il a aussi été documenté que le NO-1886 (ibrolipim), un activateur de la LPL dans le muscle squelettique, abolissait l'état d'IR chez l'animal (Kusunoki et al., 2005).

Chez l'humain, une corrélation positive a été démontrée entre la masse de la LPL plasmatique et la sensibilité à l'insuline (Hanyu et al., 2004). De plus, des études de population chez des sujets porteurs de mutations du gène de la LPL ont montré que des mutations associées à une diminution d'activité enzymatique de la LPL, étaient associées à l'IR (Holzl et al., 2002; Yang et al., 2003). L'ensemble de ces données suggère que la modulation des niveaux d'activité de la LPL puisse jouer un rôle dans l'IR.

### **I.3.3.3.3 LPL et diabète de type 2**

Les premières études examinant l'expression de la LPL dans le diabète ont été réalisées chez des rats 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, Howard, Huang, Kraemer, & Reaven, 1980; Rauramaa, Kuusela, & Hietanen, 1980). Chez ces rats, un traitement à l'insuline restaurait l'activité de la LPL adipocytaire (Ranganathan, Li, & Kern, 2000; Tavangar et al., 1992). Chez l'humain, une altération similaire de la régulation 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 administration d'insuline ou traitement hypoglycémiant permet de restaurer l'activité de la LPL adipocytaire (Simsolo, Ong, Saffari, & Kern, 1992). Le niveau d'expression de la LPL adipocytaire 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 faibles concentrations de glucose alors que l'inverse était observé en milieu hyperglycémique (Kern, Mandic, & Eckel, 1987), suggérant que non seulement la

modification des niveaux d'insuline mais aussi ceux de glucose puissent contribuer à l'atténuation de l'activité de la LPL chez les patients diabétiques mal contrôlés.

Les AGL constituent un autre facteur, retrouvé à des niveaux anormalement élevés chez les sujets diabétiques de type 2, susceptibles d'altérer la régulation de la LPL dans le diabète. Des études ont pu établir que l'activité de la LPL adipocytaire était augmentée en réponse à une diète riche en gras (Ong & Kern, 1989a). Une diète riche en AG provenant d'huiles de poisson, connue pour être anti-athérogénique, augmente aussi les niveaux d'ARNm de la LPL adipocytaire chez le rat (Murphy et al., 1993). Une augmentation similaire de la LPL adipocytaire fut observée chez des sujets diabétiques de type 2 recevant une supplémentation en AG  $\omega$ -3 sous forme d'huile de poisson (Luo et al., 1998). In vitro, une augmentation de l'expression génique de la LPL adipocytaire en réponse aux AGL est aussi documentée avec cependant une diminution de son activité (Amri, Teboul, Vannier, Grimaldi, & Ailhaud, 1996), suggérant un effet direct des AGL sur l'expression génique de la LPL.

Il est maintenant bien établi que le promoteur du gène de la LPL contient un site de liaison aux PPARs, des récepteurs nucléaires ayant, entre autres, comme activateurs les 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, stimulent l'expression de la LPL adipocytaire (McTernan et al., 2002). Plus récemment, une corrélation positive a été notée

entre l'expression de PPAR $\gamma$  et celle de LPL dans le muscle squelettique (Lapsys et al., 2000), suggérant que les TZDs puissent stimuler l'expression de la LPL musculaire via PPAR $\gamma$ . Ces résultats suggèrent la possibilité qu'en modulant le métabolisme lipidique, les TZDs puissent améliorer l'action de l'insuline directement dans les muscles.

La régulation de la LPL macrophagique a 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 & Renier, 2000). Nous avons proposé que des facteurs métaboliques altérés dans cette maladie, tels le glucose (Sartippour et al., 1998), les AGL (Michaud & Renier, 2001), l'Hcys (Beauchamp & Renier, 2002) et les AGE (Beauchamp, Michaud, Li, Sartippour, & Renier, 2004) puissent être, du moins en partie, responsables 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 libérée par ces cellules (Dobrian, Lazar, Sinescu, Mincu, & Simionescu, 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 résultats observés.

#### **I.3.3.3.4 LPL et inflammation**

De récentes études suggèrent que la LPL puisse moduler le processus inflammatoire. Qiu et coll. (Qiu, Ho, Yu, & Hill, 2007) ont démontré que la suppression de la LPL macrophagique diminuait significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  et MCP-1. Récemment Kota et coll. (Kota, Ramana, Tenorio, Enelow, & Rutledge, 2005) ont documenté un effet modulateur de la LPL sur la réponse inflammatoire produite par des cytokines au niveau endothélial. Ces auteurs ont démontré que si la LPL réduisait la réponse inflammatoire induite par le TNF $\alpha$  en inhibant l'activité du NF-kB, elle semblait aussi augmenter la réponse inflammatoire induite par l'IFN- $\gamma$  en stimulant l'activation du facteur STAT-1 (Kota et al., 2005). Finalement, il a récemment été documenté chez des souris que la surexpression de la LPL au niveau endothélial augmentait l'expression de VCAM-1 (Wang et al., 2007). Bien que ces travaux suggèrent un rôle de la LPL dans l'inflammation, d'autres études seraient requises dans le futur pour mieux cerner l'effet modulateur de la LPL sur le processus inflammatoire.



### **I.3.3.3.5 LPL et athérosclérose**

#### **I.3.3.3.5.1 Propriétés anti-athérogéniques de la LPL**

La LPL du tissu musculaire et adipeux exerce des fonctions anti-athérogéniques par sa capacité d'hydrolyser les TG des chylomicrons et des VLDL circulants, éliminant ainsi de la circulation ces lipoprotéines athérogènes. L'hydrolyse des VLDL par la LPL, en permettant le transfert des phospholipides et du cholestérol de la surface des VLDL vers les HDL, est un processus critique pour la biosynthèse des HDL (Mead, Cryer, & Ramji, 1999; Mead & Ramji, 2002b; Strauss et al., 2001). À ce titre, il n'est pas surprenant que les niveaux de HDL plasmatique, reconnus comme étant anti-athérogéniques, soient associés aux niveaux d'activité de la LPL plasmatique (Mead et al., 2002a). Diverses études expérimentales effectuées ces dernières années mettent bien en évidence les propriétés anti-athérogéniques de la LPL plasmatique. Ainsi, une réduction de lésions athéromateuses a été documentée chez des souris transgéniques surexprimant la LPL plasmatique (Clee et al., 2000). Par ailleurs, une normalisation du profil lipidique athérogénique a été documenté chez des souris déficientes en récepteurs aux LDL et en apoE, surexprimant la LPL (Shimada et al., 1996; Yagyu et al., 1999). Corroborant un rôle anti-athérogénique de la LPL plasmatique, il a également été rapporté que les TZDs, des agents hypoglycémiant utilisés dans le traitement du diabète de type 2, ainsi que les statines, des agents hypolipémiants et cardioprotecteurs, augmentaient l'activité de

la LPL dans le tissu adipeux et le muscle cardiaque des rat (Schoonjans et al., 1999; Teruel et al., 2005) ainsi que l'activité de la LPL plasmatique chez l'homme (Isley, Miles, Patterson, & Harris, 2006; Sunayama et al., 1999)

Des études cliniques, telle l'étude REGRESS, ont démontré l'existence d'une association inverse entre les niveaux d'activité de la LPL plasmatique post-héparine et la sévérité de l'angine chez les hommes atteints de maladies coronariennes (Kastelein et al., 2000). Une diminution des niveaux sériques et des niveaux d'activité de LPL post-héparine a aussi été documentée chez des patients démontrant des signes d'athérosclérose coronarienne (Hitsumoto et al., 2000; Henderson et al., 1999). Il a en outre été observé que la masse et l'activité de la LPL plasmatique post-héparine, chez des patients hypercholestérolémiques, étaient associées aux calcifications athéromateuses des artères coronaires (Dugi et al., 1997) et que certains sujets déficients en LPL développaient des lésions athéromateuses de façon précoce (Benlian et al., 1996).

Plusieurs études ont également démontré une association inverse entre les concentrations de LPL plasmatique pré-héparine et le développement de MCV (Hitsumoto et al., 2000; Hitsumoto et al., 2002; Rip et al., 2006b). Cette association est bien illustrée par le fait que de nombreux sujets porteurs d'une déficience hétérozygote en LPL ou d'une diminution de son activité, présentent un profil lipidique pro-athérogénique et un risque prématuré d'athérosclérose (Lookene, Chevreuil, Ostergaard, & Olivecrona, 1996; Goldberg & Merkel, 2001; Fisher, Humphries, & Talmud, 1997; Yang & Deeb, 1998). Ajoutons finalement

qu'une association inverse a également été observée entre les concentrations de LPL plasmatique pré-héparine et le risque de resténose suite à une angioplastie (Hitsumoto, Takahashi, Iizuka, & Shirai, 2006).

#### **I.3.3.3.5.2 Propriétés pro-athérogéniques de la LPL**

La LPL est exprimée dans les lésions athérosclérotiques et les macrophages y constituent la principale source de production (O'Brien, Gordon, Deeb, Ferguson, & Chait, 1992). Une augmentation d'expression de la LPL macrophagique est documentée dans diverses pathologies associées à une accélération de l'athérosclérose (Beauchamp, Letendre, & Renier, 2002; Sartippour et al., 2000) ainsi que chez des souris présentant une susceptibilité accrue à l'athérosclérose (Renier, Skamene, DeSanctis, & Radzioch, 1993). Diverses études menées chez des souris surexprimant spécifiquement la LPL au niveau macrophagique ont démontré le rôle proathérogénique de la LPL sécrétée par les macrophages dans la paroi artérielle (Wilson, Fry, Chappell, Sigmund, & Medh, 2001; Van, Zimmermann, Groot, Zechner, & Van Berkel, 2000). Utilisant des souris chimériques pour l'expression de la LPL macrophagique (LPL  $-/-$ , LPL  $+/-$ , LPL  $+/+$ ), Babaev et coll. (Babaev et al., 1999) ont rapporté une diminution de la surface moyenne des lésions athérogéniques de 55% chez les souris LPL  $-/-$ , comparativement aux souris LPL  $+/+$  et de 45% par rapport aux souris LPL  $+/-$ . Ces auteurs ont conclu de leurs données que la LPL macrophagique contribuait à la formation des cellules spumeuses et à l'athérosclérose in vivo. Ce groupe,

utilisant la même approche expérimentale chez des souris présentant une déficience en récepteur aux LDL, a également démontré que les lésions étaient plus importantes chez les souris LPL +/+, LDLR -/- comparativement aux souris LPL -/-, LDLR -/- (Babaev, Patel, Semenkovich, Fazio, & Linton, 2000), suggérant une contribution importante de la LPL macrophagique dans le développement des lésions précoces riches en macrophages. De manière similaire, Wu et coll. (Wu et al., 2006) ont observé que chez des lapins exprimant le gène de la LPL humaine et soumis par la suite à une injure artérielle, on observait un dépôt lipidique 7 fois plus important dans les parois artérielles que chez les lapins contrôles. Par ailleurs, des lapins surexprimant spécifiquement la LPL macrophagique humaine et soumis à une diète athérogène, présentaient pour leur part des lésions athéromateuses de surface et de l'intima, respectivement 1.4 et 2 fois plus importantes que celles observées chez des lapins contrôles (Ichikawa et al., 2005). De manière intéressante, ces lésions étaient caractérisées par l'accumulation significative de cellules spumeuses. 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.3.3.3.5.3 Mécanismes pro-athérogènes de la LPL macrophagique**

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 (Zilversmit, 1995). Les résidus de lipoprotéines ainsi produits sont captés par les macrophages (Lindqvist, Ostlund-Lindqvist, Witztum, Steinberg, & Little, 1983) et les acides gras produits au cours de l'hydrolyse des lipoprotéines peuvent être ré-estérifiés par les macrophages (Aviram, Bierman, & Chait, 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 LDL présentes dans la paroi sont susceptibles d'être oxydées par des radicaux libres, facilitant leur captation par les macrophages via les récepteurs "scavenger", et contribuant ainsi à la formation de cellules spumeuses (Mead et al., 2002b).

La LPL peut aussi jouer un rôle proathérogénique 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, le récepteur aux LDL et le récepteur aux VLDL (Mead et al., 1999), facilite la rétention et l'accumulation des lipoprotéines dans la matrice sous-endothéliale, ainsi que leur captation par les cellules vasculaires (Mead et al., 1999). Cette fonction de pont moléculaire a été vérifiée 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 moléculaire 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, Desfaits, & Renier, 1997; Obunike, Paka, Pillarisetti, & Goldberg, 1997).

#### **I.4 Récepteur de type lectine des LDLox (LOX-1)**

La captation des LDLox par les cellules vasculaires via les récepteurs "scavenger" est une étape cruciale dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. LOX-1 est un nouveau récepteur des LDLox exprimé par les cellules vasculaires en culture telles les cellules endothéliales, les macrophages et les CML. De manière importante, LOX-1 constitue au niveau endothélial le récepteur majeur des LDLox et leur captation, via ce récepteur, est impliquée dans la dysfonction endothéliale. L'expression de LOX-1 est induite par divers stimuli pathophysiologiques reliés à l'athérosclérose et à l'inflammation, incluant le  $TNF\alpha$  (Kume et al., 1998), le  $TGF\beta$  (Minami et al., 2000), le stress de cisaillement, le stress oxydatif (Murase et al., 1998), l' $IFN-\gamma$  et l' $IL-1\beta$  (Hofnagel et al., 2004), l'Hcys (Nagase et al., 2001), les LDLox (Aoyama et al., 1999; Dayan, Ben-David, & Rozen, 2000), l'AngII (Li et al., 1999a; Morawietz et al., 1999), l'ET-1 (Morawietz et al., 2001), les AGE (Chen et al., 2001), le glucose (Li, Sawamura, & Renier, 2004b) et la CRP (Li, Roumeliotis, Sawamura, & Renier, 2004a). Dans l'athérosclérose, LOX-1 est fortement exprimé par les cellules endothéliales dans les stades précoces puis par les macrophages et les CML dans l'intima des lésions athérosclérotiques plus avancées. L'ensemble de ces données suggère l'implication de LOX-1 dans le processus athérosclérotique

#### **I.4.1 Structure, organisation et analyse du promoteur du gène LOX-1**

Le gène codant pour LOX-1 mesure plus de 7 kb et comporte 6 exons et 5 introns. L'exon 1 code pour la région non transcrite 5' du gène ainsi que pour le domaine cytoplasmique. Le reste du domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire de la protéine sont codés par l'exon 2. Le domaine *NECK* est codé par l'exon 3 et finalement, le domaine lectine et la région non transcrite 3' sont codés par les exons 4 à 6. Poly (A) + est attaché à l'ARNm de LOX-1, à 23pb de distance en aval du motif AATAAA. Plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription sont présents sur la région 5' du gène. Les sites de liaison au *GATA-2* sont présents à -180 et 1676 pb et sont reconnus comme médiant l'expression endothéliale d'ET-1 (Kawana, Lee, Quertermous, & Quertermous, 1995). *C-ets-1* est présent à -2274 pb et est exprimé par les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse et de la vascularisation des tumeurs. Il est également impliqué dans la régulation du récepteur au VEGF (Macleod, Leprince, & Stehelin, 1992; Morishita, Johnson, & Williams, 1995). Les éléments de réponse au 12-O-Tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) (TRE) sont présents à -60, -984 et -1714pb. Ces éléments constituent des sites de liaison pour l'AP-1 et sont responsables de l'induction de la transcription de certains gènes par la PKC et l'ester de phorbol (Angel et al., 1987).

Un élément de réponse au stress de cisaillement (SSRE, GAGACC) est présent à -1147 et 1011 pb. SSRE pourrait être impliqué dans l'expression, médiée par NF-kB, du gène LOX-1 (Collins et al., 1995; Khachigian, Resnick, Gimbrone, Jr., & Collins, 1995). La boîte TATA est située à -29 pb tandis que la



boîte CAAT est située à -99 pb. L'analyse de la séquence flanquante 5' du gène LOX-1 chez le rat a démontré la présence de six sites AP-1, quatre motifs AP-2, un site NF-kB et un site SSRE (Nagase et al., 1998). La séquence consensus de NF-kB présente sur le promoteur du gène LOX-1 chez le rat, code pour une séquence "gggattttac". La présence de ces éléments sur le promoteur du gène LOX-1 indique qu'il s'agit d'un gène pouvant être régulé à plusieurs sites.

#### **I.4.2 Structure de la protéine**

LOX-1 est une glycoprotéine membranaire de type II de 50 kD dont la structure appartient à la famille des lectines de type C. Un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD) est présent sur les protéines de cette famille. Selon l'architecture globale des protéines, la position du domaine CRD et le degré d'homologie des domaines CRD, les protéines de cette famille ont été classées selon 7 groupes (Aoyama et al., 1999). Le groupe I inclut les protéoglycans, le groupe II inclut les lectines hépatiques, le récepteur aux cellules Kupffer (KCR) et l'antigène d'activation du lymphocyte CD23. Le groupe III inclut les collectines avec des protéines de liaison au mannose, l'apoprotéine de surfactant pulmonaire et la conglutinine. Le groupe IV inclut les L-, P- et E-selectines. Le groupe V est un deuxième groupe de protéines membranaires de type -II incluant NKR-P1, Ly49 et CD69. Le groupe VI contient la famille des récepteurs au mannose. Le groupe VII contient le CRD libre. LOX-1, lui, fait partie du groupe V de la famille des lectines de type C (Drickamer, 1988). Il possède une structure protéique membranaire de type II avec un domaine N-terminal court et de

longs domaines carboxy-terminaux hydrophiles, séparés par des domaines hydrophobes de 26 acides aminés (Sawamura et al., 1997).

#### **I.4.2.1 Structures et fonctions des domaines de LOX-1**

La protéine LOX-1 est constituée de quatre domaines, incluant un domaine N-terminal court, un domaine transmembranaire, le domaine NECK et le domaine lectine de type C (Sawamura et al., 1997). Plusieurs sites potentiels de phosphorylation, incluant Thr21 et Ser28 pour la PKC et Thr2 pour les kinases de caséine de type II, ont été identifiés sur le domaine cytoplasmique N-terminal. La phosphorylation de ces sites est impliquée dans la signalisation et la régulation de LOX-1. Une séquence répétitive de six cystéines dans le domaine de type lectine est conservée dans toutes les espèces. Tronquer ou supprimer le domaine de type lectine entraîne une perte de la capacité de LOX-1 de lier les LDLox, les cellules sénescents et apoptotiques et les phospholipides chargés négativement (Chen, Narumiya, Masaki, & Sawamura, 2001). Ces données appuient la fonction de liaison aux ligands et d'initiateur du processus d'internalisation et de phagocytose de ce domaine.

#### **I.4.2.2 Modifications post-translationnelles de LOX-1**

De nombreuses évidences indiquent que la protéine LOX-1 est initialement synthétisée sous forme d'un précurseur de 40-kDa (pré-LOX-1) comprenant des hydrates de carbone riches en mannose sur le domaine N-terminal. Plusieurs sites de glycosylation étant situés dans le domaine extracellulaire C-terminal de la

protéine LOX-1, celle-ci est par la suite glyquée pour donner naissance à une protéine mature de 50-kDa qui sera transportée à la surface cellulaire (Kataoka et al., 2000). Il a été suggéré que la glycosylation de LOX-1 régule, en partie, sa capacité de transport intracellulaire et son activité de liaison au ligand. Une altération de la glycosylation de LOX-1 pourrait donc affecter ses fonctions biologiques *in vivo*.

#### **I.4.2.3 Formes solubles de LOX-1**

Plusieurs protéines membranaires peuvent être converties en molécules solubles par un clivage protéolytique (Ehlers & Riordan, 1991; Rose-John & Heinrich, 1994; Hooper, Karran, & Turner, 1997). LOX-1 est l'une de ces protéines trans-membranaires pouvant être clivée au niveau de la région juxtamembranaire de son domaine extracellulaire. La forme soluble de LOX-1 sécrétée possède un poids moléculaire de 35-kDa (Kume & Kita, 2001). Étant donné que le fluorure de phenylmethylsulfonyl inhibe la libération de la forme soluble de LOX-1, *in vitro*, il a été suggéré que des sérines protéases sensibles au fluorure de phenylmethylsulfonyl pourraient être impliquées dans le processus de sécrétion de la forme soluble de LOX-1 *in vivo*. L'analyse des niveaux sériques de LOX-1, *in vivo*, pourrait constituer une nouvelle stratégie pour l'évaluation et la prédiction de l'athérosclérose et des MCV (Kume et al., 2001).

### **I.4.3 Distribution tissulaire de LOX-1**

LOX-1 est exprimé non seulement in vitro par les cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales, les macrophages, les CML, les fibroblastes et les plaquettes mais également par de nombreux tissus in vivo (Draude, Hrboticky, & Lorenz, 1999; Moriwaki et al., 1998a; Sawamura et al., 1997; Yoshida, Kondratenko, Green, Steinberg, & Quehenberger, 1998). En effet, LOX-1, est exprimé in vivo, entre autres, dans l'aorte, les carotides, les veines et les artères du thorax et du cœur. Ce récepteur est principalement exprimé dans l'intima de l'aorte et les organes richement vascularisés comme les poumons, le placenta, le cerveau et le foie.

### **I.4.4 Ligands de LOX-1**

LOX-1 possède une capacité de liaison à plusieurs ligands. Ceux-ci peuvent être classés en cinq groupes. Le groupe 1 contient les lipoprotéines modifiées incluant les LDLox, les LDL acétylées et les HDL modifiées par l'hypochlorite (Marsche et al., 2001; Moriwaki et al., 1998b; Sawamura et al., 1997). Le groupe 2 contient des produits polyanioniques comme l'acide polyinosinique et le carrageen. Le groupe 3 contient des phospholipides anioniques tels que le phosphatidylinositol et la phosphatidylserine (PS) (Moriwaki et al., 1998b; Oka et al., 1998). Le groupe 4 contient des ligands cellulaires tels que les cellules sénescents et apoptotiques, des plaquettes activées et des bactéries (Kakutani, Masaki, & Sawamura, 2000). Le groupe 5 inclut les AGE (Jono et al., 2002).

### **I.4.5 Régulation de l'expression de LOX-1**

L'expression de LOX-1 peut être modulée par plusieurs stimuli pro-inflammatoires et pro-athérosclérotiques ainsi que par le stress oxydatif, certaines pathologies et médicaments.

#### **I.4.5.1 Cytokines pro-inflammatoires**

L'expression de LOX-1 peut être induite par la cytokine pro-inflammatoire  $TNF\alpha$  dans les cellules endothéliales et les macrophages (Kume et al., 1998; Moriwaki et al., 1998a). Elle peut également être induite par d'autres cytokines pro-inflammatoires incluant l'IL-1 $\beta$  (Nakagawa et al., 2002b), l'IFN- $\gamma$  (Hofnagel et al., 2004) et l'ET-1 (Morawietz et al., 2001).

#### **I.4.5.2 Stimuli pro-athérosclérotiques**

Outre les cytokines pro-inflammatoires, plusieurs stimuli pro-athérosclérotiques modulent l'expression de LOX-1 dans les cellules vasculaires, in vitro. Par exemple, le TGF- $\beta$  a été démontré comme pouvant augmenter l'expression de LOX-1 dans les cellules endothéliales, les macrophages et les CML (Chen, Li, Saldeen, & Mehta, 2001). Le stress de cisaillement a été démontré comme pouvant moduler de nombreuses fonctions endothéliales, incluant l'expression de plusieurs gènes comme l'ET-1 (Kuchan & Frangos, 1993; Malek, Greene, & Izumo, 1993), le TGF- $\beta$  (Ohno, Cooke, Dzau, & Gibbons, 1995) et le MCP-1 (Shyy, Hsieh, Usami, & Chien, 1994). Murase et coll. (Murase et al., 1998)

ont fourni des évidences selon lesquelles le stress de cisaillement induit l'expression de LOX-1 dans les cellules endothéliales vasculaires, suggérant un rôle de LOX-1 dans la formation des lésions athéromateuses in vivo.

L'expression de LOX-1 est également augmentée par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Yoshida et al., 1998), la LPS (Kume et al., 1998), l'AngII (Li, Zhang, Philips, Sawamura, & Mehta, 1999b; Morawietz et al., 1999), l'Hcys (Nagase et al., 2001), les AGE (Chen et al., 2001) et la CRP (Li et al., 2004a).

#### **1.4.5.3 Stress oxydatif**

La régulation de LOX-1 est rédox-sensible ; l'expression de LOX-1 est augmentée par les produits du stress oxydatif et par les agents induisant le stress oxydatif. En effet, Nagase et coll. (Nagase et al., 2001) ont démontré que des espèces radicalaires oxygenées, telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peuvent augmenter l'expression de LOX-1 dans les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Plus récemment, Muscoli et coll. (Muscoli et al., 2004) ont observé qu'une injure à l'artère carotide, induite par un cathéter à ballonnet chez le rat, était associée à une augmentation de l'expression de LOX-1 ainsi qu'à une augmentation des niveaux de stress oxydatif et que l'utilisation de M40401, un puissant antioxydant, réduisait parallèlement l'étendue des dommages causés à la carotide et l'expression de LOX-1. À noter que l'expression de LOX-1 peut être augmentée non seulement par les LDLox mais également par un de ses

constituants lipidiques athérogènes, le lysophosphatidylcholine (LPC) (Aoyama, Chen, Fujiwara, Masaki, & Sawamura, 2000; Mehta & Li, 1998).

L'expression de LOX-1 est également induite par de nombreux stimuli associés au stress oxydatif, tel que les 8-iso-prostaglandine F2 $\alpha$  (8-iso-PGF2 $\alpha$ ), un marqueur de stress oxydatif in vivo (Morrow, Minton, & Roberts, 1992). Les 8-iso-PGF2 $\alpha$  augmentent aussi l'expression de LOX-1 au niveau protéique et génique dans des cellules JAR humaines (Halvorsen, Staff, Henriksen, Sawamura, & Ranheim, 2001). Les AGE qui sont reconnus comme induisant le stress oxydatif, lient LOX-1 et augmentent son expression dans les HAECs (Chen et al., 2001; Jono et al., 2002), tout comme l'Hcys, un acide aminé athérogène qui exerce ses effets via l'augmentation du stress oxydatif et dont l'action sur l'expression de LOX-1 peut être inhibée par l'antioxydant N-acetylcystéine (NAC) (Holven et al., 2003; Jono et al., 2002; Nagase et al., 2001).

Notre laboratoire a également démontré que l'augmentation de l'expression de LOX-1 par le glucose est médiée via le facteur de transcription AP-1, un facteur rédox-sensible (Li et al., 2004b). Les voies de signalisation rédox-sensibles MAPK et PKC sont également impliquées dans la régulation de LOX-1 (Mehta, Chen, Yu, & Li, 2004; Li, Liu, Chen, Sawamura, & Mehta, 2003). L'ensemble de ces résultats démontre clairement que LOX-1 est régulé par le stress oxydatif.

#### I.4.5.4 Médicaments

La simvastatine et l'atorvastatine sont des médicaments de la famille des statines utilisés dans le traitement de l'hypercholestérolémie et qui diminuent significativement l'expression et l'activation de LOX-1 induite par les LDLox (Li et al., 2002a). Mehta et coll. (Mehta, Li, Chen, Joseph, & Romeo, 2001) ont proposé que cet effet puisse être attribuable à l'effet inducteur de ces médicaments sur l'expression de eNOS. Parmi les autres médicaments pouvant diminuer l'expression de LOX-1, notons l'aspirine (Mehta et al., 2004), le Tempo, un médicament mimant les effets d'une superoxyde dismutase (Nagase et al., 2001) et le losartan, un ACE diminuant l'expression de LOX-1 induite par l'AngII (Li et al., 1999b; Morawietz et al., 1999). Les ligands de PPAR $\gamma$ , incluant le 15-deoxy-Delta (12-14)-prostaglandin J(2) (15d-PGJ(2)), les TZDs, pioglitazones et troglitazones, peuvent aussi diminuer les niveaux d'ARNm de LOX-1 induits par le TNF $\alpha$  dans les BAEC (Chiba, Ogita, Ando, & Fujita, 2001). La L-arginine, un puissant antioxydant, diminue également l'expression de LOX-1 (Kosaka et al., 2003). Finalement, Ouslimani et coll. (Ouslimani et al., 2007) ont récemment démontré que la metformine, un antidiabétique possédant des propriétés antioxydantes, diminuait l'expression endothéliale de LOX-1.



#### **I.4.6 Rôle de LOX-1 dans des états pathologiques**

L'expression basale de LOX-1 est faible in vivo mais elle peut être augmentée par plusieurs conditions pathologiques, incluant l'hypertension, le diabète, l'hyperlipidémie, l'athérosclérose, la transplantation, l'ischémie-reperfusion, l'arthrite rhumatoïde et l'ostéoarthrite.

##### **I.4.6.1 LOX-1 et dysfonction endothéliale**

L'activation endothéliale est l'étape la plus précoce dans le développement de l'athérosclérose. De nombreuses évidences indiquent que les LDLox jouent un rôle majeur dans l'activation et la dysfonction de l'endothélium. En effet, les LDLox diminuent l'expression de eNOS, augmentent l'expression de molécules d'adhésion et du MCP-1 et favorisent l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Mehta, Chen, Hermonat, Romeo, & Novelli, 2006). LOX-1 joue un rôle crucial comme médiateur des effets délétères des LDLox puisque l'inhibition de LOX-1 par l'utilisation d'une séquence antisens dirigée contre LOX-1, réduit les effets proathérogéniques des LDLox (Li et al., 2002a; Li & Mehta, 2000a). Les voies de signalisation impliquées dans la dysfonction endothéliale induite par les LDLox incluent la génération de ROS, l'activation de protéines kinases et du facteur de transcription NF-kB (Li et al., 2002a; Mehta et al., 2006). L'utilisation d'une séquence antisens dirigée contre LOX-1 a démontré que c'est la liaison des LDLox à LOX-1 qui initie ces processus intracellulaires (Li & Mehta, 2000b).

#### **I.4.6.2 LOX-1 et athérosclérose**

Les LDLox jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose et, en tant que principal récepteur endothélial pour ceux-ci, LOX-1 médie la vaste majorité des effets toxiques des LDLox (Kita et al., 2001). L'expression de LOX-1 est augmentée par de multiples stimuli pathophysiologiques reliés à l'inflammation et à l'athérosclérose (Li et al., 2004a; Li et al., 2004b; Hofnagel et al., 2004; Kume et al., 1998; Minami et al., 2000; Murase et al., 1998; Nagase et al., 2001; Aoyama et al., 1999; Dayan et al., 2000; Li et al., 1999a; Morawietz et al., 1999; Morawietz et al., 2001; Chen et al., 2001). LOX-1 est de plus exprimé in vivo dans les grosses artères (aortique, carotidienne, thoracique, artères et veines coronariennes), celles-ci étant les sites de prédilection de l'athérosclérose (Sawamura et al., 1997; Shi, Niimi, Ohtani, & Machida, 2001). De manière encore plus pertinente, LOX-1 est exprimée in vivo dans l'aorte d'animaux hypertendus (Nagase, Hirose, Sawamura, Masaki, & Fujita, 1997), diabétiques (Chen et al., 2001) et hyperlipidémiques (Chen et al., 2000; Kakutani, Ueda, Naruko, Masaki, & Sawamura, 2001) et sa surexpression chez la souris apoE, induit une vasculopathie intra-myocardiale (Inoue, Arai, Kurihara, Kita, & Sawamura, 2005).

Dans les lésions athérosclérotiques précoces, l'expression de LOX-1 est particulièrement prononcée au niveau de l'endothélium et la captation des LDLox par ce récepteur induit une multitude de changements fonctionnels et phénotypiques, pertinents à la dysfonction endothéliale (Chen, Masaki, & Sawamura, 2002; Cilingiroglu & Ozer, 2005). Par exemple, l'activation de LOX-1 dans les cellules endothéliales entraîne la production d'anions superoxydes et

active le facteur NF- $\kappa$ B, responsable des changements dans l'expression génique et le phénotype des cellules endothéliales.

Un rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose est également supporté par le fait que ce récepteur agit aussi en tant que molécule d'adhésion pour les plaquettes activées et les cellules mononuclées (Kakutani et al., 2000; Hayashida, Kume, Minami, & Kita, 2002) et pourrait ainsi promouvoir le recrutement de cellules inflammatoires et la thrombose vasculaire.

Dans les lésions athérosclérotiques avancées, les macrophages de l'intima et les CML démontrent une forte expression de LOX-1. L'expression de LOX-1 dans ces cellules pourrait contribuer à la formation des cellules spumeuses (Li et al., 2004b; Smirnova, Kajstura, Sawamura, & Goligorsky, 2004) et à l'hyperplasie de l'intima (Hinagata et al., 2006). Bien que l'augmentation de LOX-1 dans les lésions précoces suggère un rôle significatif de LOX-1 dans l'initiation de l'athérosclérose, son accumulation de façon persistante dans les lésions athérosclérotiques avancées, suggère également des effets à long terme de ce récepteur pouvant être impliqués dans la pathogénèse de la rupture de la plaque athérosclérotique. En accord avec cette possibilité, il a été rapporté que LOX-1 médie les effets des LDLox sur l'apoptose des cellules vasculaires (Kataoka et al., 2001; Li et al., 2000b; Kume & Kita, 2004) et l'expression des MMP (Li et al., 2003a) et un rôle de ce récepteur dans la déstabilisation des plaques athéromateuses in vivo vient d'être proposé (Ishino et al., 2007). Finalement, il a été récemment suggéré que la forme soluble de LOX-1 puisse constituer un marqueur de diagnostic précoce du syndrome coronarien aigu (Hayashida et al., 2005). Prises

globalement, ces données suggèrent donc que l'expression de LOX-1 dans les phases précoces de l'athérosclérose pourrait, en facilitant la captation des LDLox, induire la dysfonction endothéliale et, avec la progression de la maladie, promouvoir la progression de la plaque athérosclérotique et sa rupture. Le rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose est résumé à la Figure 7.

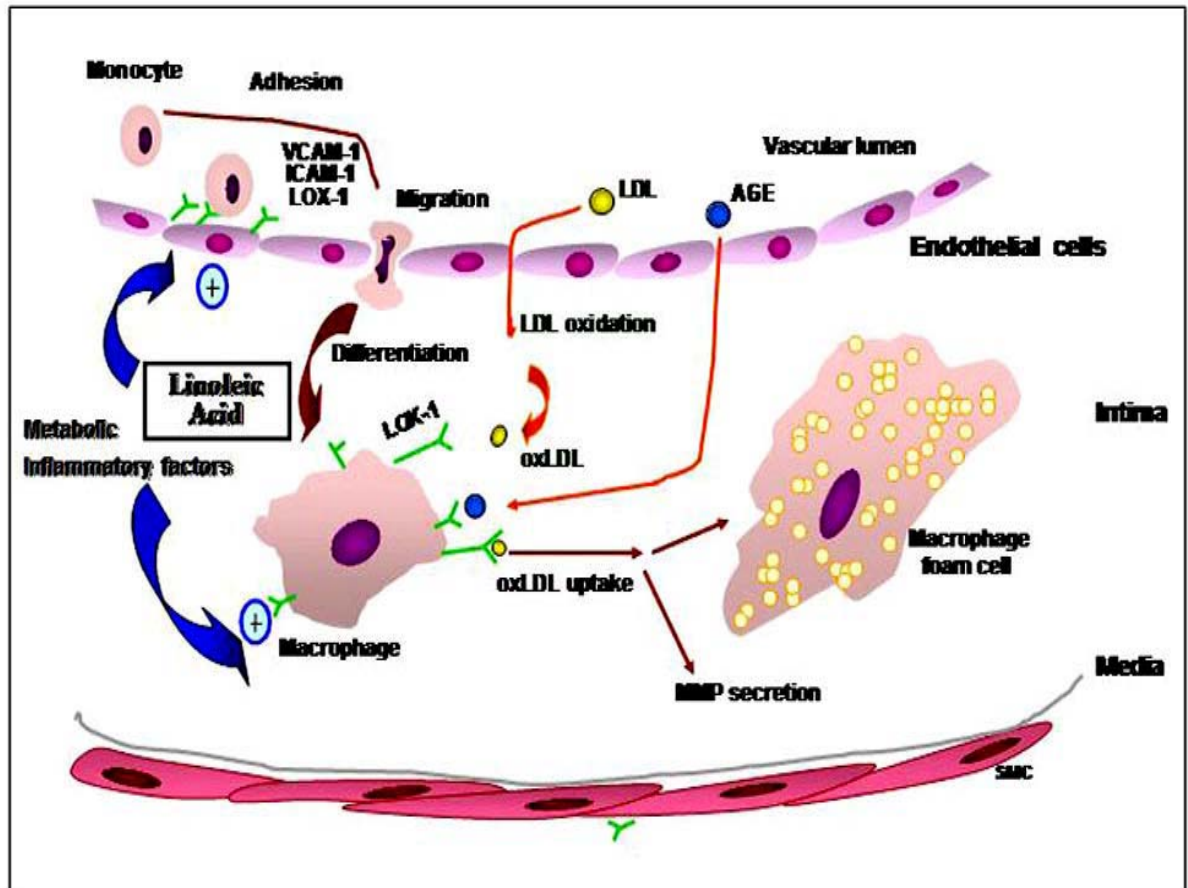


Figure 7. Rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose. LOX-1 est exprimé par les cellules endothéliales, les macrophages et les CML. LOX-1 est une molécule d'adhésion, impliquée dans la dysfonction endothéliale, l'initiation et la progression de l'athérosclérose. L'expression de LOX-1 est augmentée par des stimuli pro-inflammatoires et pro-athérosclérotiques. Les AGEs et les LDLox sont des ligands pour LOX-1.

#### **I.4.6.3 LOX-1 et diabète**

Notre laboratoire a démontré que des concentrations élevées de glucose augmentent l'expression de LOX-1 par les macrophages et les cellules endothéliales et que les macrophages isolés de patients diabétiques de type 2 surexpriment LOX-1 (Li, Sawamura, & Renier, 2003d). L'expression de LOX-1 est de plus augmentée dans l'aorte de rats diabétiques (Kita et al., 1999). Une autre étude a observé que le sérum de rats diabétiques et les AGE induisent l'expression endothéliale de LOX-1 et que l'activité de ses ligands est augmentée dans leur sérum (Chen et al., 2001). Finalement, Chui et coll. (Chui, Guan, Lehrke, & Lazar, 2005) ont démontré que LOX-1 joue un rôle critique dans la régulation du métabolisme lipidique des adipocytes et potentiellement dans la sensibilité à l'insuline de ces cellules en réponse aux ligands de PPAR $\gamma$ . Ces données suggèrent donc un rôle de ce récepteur dans l'initiation et la progression de la vasculopathie diabétique.

#### **I.4.6.4 LOX-1 et hypertension**

L'expression de base de LOX-1 dans l'aorte de rats normaux est faible mais est significativement augmentée chez les rats hypertendus (Nagase et al., 1997). De plus, l'AngII augmente l'expression génique de LOX-1 dans les cellules endothéliales (Li et al., 1999b) et les inhibiteurs de ACE diminuent de façon marquée l'expression génique de LOX-1 (Morawietz et al., 1999). L'expression de LOX-1 est induite par l'activation du système rénine-angiotensine (RAS), un

système jouant un rôle clé dans la pathogénèse de l'hypertension. L'induction de LOX-1 par le RAS contribuerait à la diminution de la vasorelaxation de l'endothélium observée dans l'hypertension (Mehta et al., 2006).

#### **I.4.6.5 LOX-1 et inflammation/réponse immunitaire**

Les étapes initiales de l'infection bactérienne impliquent l'adhésion des bactéries aux cellules endothéliales vasculaires, aux cellules épithéliales et à celles de la muqueuse. Il a été rapporté que LOX-1 supporte l'adhésion des bactéries Gram+ et Gram- aux cellules endothéliales, suggérant donc un rôle de LOX-1 dans l'inflammation bactérienne (Shimaoka et al., 2001). Jeannin et coll. (Jeannin et al., 2005) ont récemment démontré que la bactérie *pneumonia* active les macrophages et les cellules dendritiques via LOX-1. LOX-1 est de plus impliqué dans l'inflammation induite par l'endotoxine ainsi que dans le recrutement et l'infiltration de leucocytes in vivo (Honjo et al., 2003). Comme mentionné précédemment (I.4.5.1), plusieurs cytokines pro-inflammatoires augmentent l'expression de LOX-1 et des études in vivo ont démontré que plusieurs de ces cytokines sont co-localisées avec LOX-1 dans les lésions athéromateuses avancées (Hofnagel et al., 2004). L'ensemble de ces études suggère que LOX-1 joue un rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire.

#### **I.4.6.6 LOX-1 et dommage myocardique d'ischémie-reperfusion**

De nombreuses évidences suggèrent que les LDLox jouent un rôle délétère dans le dommage myocardique d'ischémie-reperfusion. Premièrement, les LDLox sont présentes dans les lésions athéromateuses de segments d'artères vulnérables à la rupture (Ehara et al., 2001). Deuxièmement, le degré d'ischémie myocardique est corrélé de façon positive aux taux sériques des LDLox (Ehara et al., 2001). Troisièmement, des études in vitro ont démontré que la perfusion de cœurs de rats avec des LDLox, diminue significativement la contraction myocardique (Harrison, Jordan, Selley, & Willis, 1995). L'expression de LOX-1 dans le myocarde est augmentée chez des rats soumis à une ischémie-reperfusion du myocarde et le traitement de ces animaux par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre LOX-1, prévient l'augmentation d'expression de LOX-1 causée par l'ischémie-reperfusion tout en réduisant l'apoptose, la peroxydation lipidique et l'étendue des dommages myocardiques et en améliorant la fonction ventriculaire gauche (Li et al., 2003c).

#### **I.4.6.7 LOX-1 et arthrite rhumatoïde et ostéoarthrite**

Une augmentation de l'expression de LOX-1 dans l'endothélium synovial et les veinules post-capillaires a été documentée dans un modèle d'arthrite induite par le zymosan chez le rat. Dans ce modèle, l'administration d'un anticorps dirigé contre LOX-1 réduisait l'œdème des jointures, l'infiltration leucocytaire et l'accumulation de nitrites intraarticulaire ainsi que la destruction du cartilage, suggérant un rôle de LOX-1 dans l'arthrite rhumatoïde (Nakagawa et al., 2002a).



Un rôle de LOX-1 dans la pathogenèse de l'ostéoarthrite est aussi postulé. À cet effet, Akagi et coll. (Akagi et al., 2007) ont observé une augmentation de l'expression de LOX-1 dans des échantillons de cartilages humains prélevés chez des patients souffrant d'ostéoarthrite. Chez ces sujets, la présence des LDLox et le niveau d'expression de LOX-1 étaient corrélés à la sévérité de la maladie. Il a aussi été démontré que les LDLox diminuaient la viabilité des chondrocytes humains ainsi que la synthèse de protéoglycans et que ces effets étaient médiés par LOX-1. Finalement, Kanata et coll. (Kanata et al., 2006) ont démontré in vitro que la liaison des LDLox au LOX-1 dans des chondrocytes bovins, augmentait l'expression de VEGF, un facteur de croissance jouant un rôle primordial dans l'ostéoarthrite en détruisant le cartilage des articulations. Ces études supportent donc un rôle de LOX-1 comme médiateur des effets délétères des LDLox sur l'intégrité du cartilage.

## **I.5 Hypothèse de travail**

La prévalence du diabète de type 2 atteint des proportions épidémiques. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique, multifactorielle, dont l'incidence est 2 à 4 fois plus élevée chez les patients diabétiques que chez des individus normaux. Fait important, 80% des diabétiques meurent suite à un accident cardiovasculaire. Bien que l'association entre le diabète et les MCV soit bien documentée, les mécanismes responsables de cette prévalence accrue d'athérosclérose chez les sujets diabétiques de type 2, n'ont pas encore été complètement élucidés.

De nombreuses évidences indiquent que la liaison et la captation des LDLox par les cellules vasculaires constitue une étape clé dans l'initiation et la progression des lésions athérosclérotiques. Par leur liaison au LOX-1 exprimé par les cellules endothéliales, les LDLox induisent, nous l'avons vu, un état de dysfonction endothéliale, caractérisé par une diminution d'expression de eNOS, une augmentation d'expression des molécules d'adhésion et du MCP-1 et une adhésion accrue des monocytes à l'endothélium. De plus, par leur capacité à se lier conjointement à la LPL et aux récepteurs de lipoprotéines présents à la surface des macrophages, elles président à la formation des cellules spumeuses, constituants majeurs de la strie lipidique.

Le diabète de type 2 se caractérise par une susceptibilité accrue des LDL à l'oxydation et par une augmentation de divers facteurs proathérogéniques. Parmi eux, le LOX-1 et la LPL macrophagique ont été impliqués dans le développement précoce de la lésion athéromateuse et sont considérés comme des médiateurs clé

des effets proathérogéniques des LDLox. L'augmentation d'expression de ces deux facteurs dans le diabète de type 2 traduit leur implication potentielle dans le développement de la vasculopathie diabétique.

Notre laboratoire a poursuivi ces dernières années divers travaux portant sur la régulation de LOX-1 et de la LPL macrophagique dans le diabète. Nous avons démontré que l'hyperglycémie et la CRP stimulaient l'expression endothéliale de LOX-1 in vitro et avons documenté un effet inducteur du glucose, des acides gras et des AGE sur la sécrétion macrophagique de LPL. Afin de compléter nos travaux sur la régulation de LOX-1 et de la LPL macrophagique dans le diabète de type 2, nous avons choisi de poursuivre nos recherches sur la régulation de LOX-1 par les acides gras et de caractériser le rôle de la CRP et de la leptine dans le contrôle de l'expression macrophagique de LPL.

Comme mentionné précédemment, des niveaux accrus d'acides gras libres sont impliqués dans le développement de la dysfonction endothéliale associée au diabète de type 2 et plusieurs de leurs effets délétères au niveau endothélial reproduisent ceux induits par l'activation de LOX-1 par les LDLox. Si ces données suggèrent un rôle modulateur des acides gras sur l'expression de LOX-1, il n'existe pas actuellement d'étude à ce sujet. L'acide gras choisi pour effectuer cette étude s'est porté sur LA, un acide gras dont les concentrations sont augmentées dans toutes les sous-fractions des LDL des patients diabétiques et qui est bien caractérisé en tant que molécule pro-inflammatoire et pro-oxydative induisant l'activation et la dysfonction endothéliale.

Au vu de leurs valeurs prédictives de MCV, de leur augmentation dans le diabète et de leurs effets pro-inflammatoires et immunomodulateurs, nous avons en outre étudié le rôle de la leptine et de la CRP dans la régulation de l'expression macrophagique de la LPL.

Nos hypothèses de travail étaient donc que:

- 1) Le LOX-1 jouait un rôle de médiateur dans l'état de dysfonction endothéliale induite par les acides gras.
- 2) Une surproduction macrophagique de LPL était impliquée dans les effets proathérogéniques de la CRP et de la leptine.

Les objectifs spécifiques de notre travail étaient :

- 1) Examiner l'effet direct de la leptine et de la CRP sur l'expression de la LPL macrophagique et vérifier les voies de signalisation et les mécanismes impliqués dans cette régulation.
- 2) Examiner l'effet direct de LA sur l'expression endothéliale de LOX-1, sur la captation des LDLox par les cellules endothéliales et vérifier les voies de signalisation et les mécanismes impliqués dans cette régulation.

## **II. Résultats**

## **II.1 Premier article**

*Diabetes* 52: 2121-2128, 2003

**LEPTIN INCREASES LIPOPROTEIN LIPASE SECRETION BY MACROPHAGES  
INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS AND PROTEIN KINASE C**

Fritz Maingrette<sup>1</sup> and Geneviève Renier<sup>1,2</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Nutrition, University of Montreal and the <sup>2</sup>Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

Keywords: leptin, macrophage, lipoprotein lipase, atherosclerosis.

Address correspondence and reprint requests to:

Dr Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
Research Centre  
3<sup>rd</sup> floor, Y-3622  
1560 Sherbrooke East  
Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1  
E-mail: [genevieve.renier@umontreal.ca](mailto:genevieve.renier@umontreal.ca)

## **SUMMARY**

Recent data suggest that plasma leptin may represent a cardiovascular risk factor in diabetic patients. To get further insight into the role of leptin in atherogenesis associated with diabetes, we investigated in the present study the role of this hormone in the regulation of macrophage lipoprotein lipase (LPL), a proatherogenic cytokine overexpressed in patients with type 2 diabetes. Treatment of human macrophages with leptin (1-10 nmol/l) increased LPL expression, both at the mRNA and protein levels. Pretreatment of these cells with anti-leptin receptor (Ob-R) antibody, protein kinase C inhibitors, calphostin C and GF109203X, or the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) blocked the effects of leptin. Similar results were observed in leptin-treated J774 macrophages. In these cells, leptin increased the membrane expression of conventional PKC isoforms and down regulation of endogenous PKC expression abolished the effects of leptin on macrophage LPL expression. In leptin-treated J774 cells, enhanced LPL synthetic rate and increased binding of nuclear proteins to the activated protein-1 (AP-1) consensus sequence of the LPL gene promoter were also observed. This latter effect was abrogated by GF109203X. Overall, these data demonstrate that binding of leptin at the macrophage cell surface increases, through oxidative stress- and PKC-dependent pathways, LPL expression. This effect appears to be exerted at the transcriptional level and to involve AP-1 activation.



## INTRODUCTION

Leptin is a 16-kD peptide hormone that is produced mainly by adipocytes and plays a central role in the regulation of body weight. Plasma leptin levels correlate with body mass index (1) and are 3 to 4 times higher in obese and diabetic patients (2,3). The broad distribution of leptin receptor expression in a variety of tissues accounts for the pleiotropic functions of this hormone in lipid metabolism, hematopoiesis, pancreatic cell function, thermogenesis and response to lipopolysaccharide (4). Recently, a role for leptin in the control of inflammation has been proposed. Indeed, it has been demonstrated that leptin stimulates the proliferation, differentiation and functional activation of hemopoietic cells including monocytes/macrophages, and increases the production of proinflammatory cytokines (5-7). These results and the findings that leptin modulates key processes involved in atherogenesis including angiogenesis, oxidative stress, vascular calcification and thrombosis (8-12) suggest a role for leptin as a potential cardiovascular risk factor in obese and diabetic patients. This possibility is further supported by recent observations showing that leptin receptors are expressed in human atherosclerotic lesions and that plasma leptin is independently associated with the intima-media thickness of the carotid artery and represents an independent predictor of first-ever acute myocardial infarction and hemorrhagic stroke (13-15).

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipid metabolism. Contrary to the anti-atherogenic effect of plasma LPL, LPL secreted by macrophages in the arterial wall is a pro-atherogenic molecule (16,17). Indeed, it has been shown that LPL promotes the retention of lipoproteins in the subendothelial space (18) and favors monocyte adhesion to the endothelium (19,20). It also stimulates the transformation of macrophages into foam cells, the production of proinflammatory cytokines and the proliferation of smooth muscle cells (21-24).

We have previously demonstrated that macrophages of patients with type 2 diabetes overexpress LPL (25) and have characterized the role of metabolic factors in this alteration (26-28). In the present study, we investigated the role of leptin in the induction of macrophage LPL in diabetes. Our data which demonstrate that leptin increases macrophage LPL secretion in vitro support the possibility that leptin may represent a macrophage LPL-stimulatory factor in diabetes. Leptin-induced macrophage LPL may contribute to the increased incidence of atherosclerotic events seen in patients with type 2 diabetes.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Wisent (St-Bruno, Quebec, Canada). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), RPMI-1640 medium, penicillin-streptomycin, phorbol myristate acetate (PMA) and Trizol reagent were purchased from Gibco-BRL (Burlington, Ontario, Canada). Human recombinant leptin, rabbit monoclonal antibody against the leptin receptor recognizing both the Ob-Ra and Ob-Rb isoforms of the leptin receptor and IgG<sub>1</sub> neutralizing antibody were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectively. Endotoxin content of the leptin preparation (1 nmol/l) was determined by the Limulus amoebocyte lysate assay (Sigma, St-Louis, MO) and was consistently found to be less than 6 pg/ml. 4 $\alpha$ -PMA and heparin were purchased from Sigma (St-Louis, MO). Calphostin C, N-acetylcysteine (NAC), GF109203X, wortmannin and PD98059 were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). [<sup>35</sup>S] was provided by ICN Biochemicals (Costa Mesa, CA).

### **Macrophages**

Human monocytes were isolated as previously described (29). Peripheral blood mononuclear cells were isolated from venous blood of healthy subjects by density-gradient sedimentation using Ficoll, allowed to aggregate in the presence of FCS, then further purified by the rosetting technique. After density centrifugation, highly purified monocytes (85-90%) were recovered as assessed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Rutherford, NJ) using phycoerythrin-conjugated anti-

CD14 monoclonal antibody (Becton Dickinson). Differentiation of monocytes into macrophages was achieved by culturing the cells 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. Levels of LPL mass and activity were measured 24 hours after the last medium change.

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% FCS and 100 µg/ml penicillin-streptomycin.

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

Expression of the LPL gene in human macrophages was performed by semi-quantitative 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 (30). 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 µg of total cellular RNA with 0.1 µg 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 µmol/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 21 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). Titrating the cDNA samples ensured that the signal lies on the exponential part of the standard curve.

Determination of LPL gene expression in murine macrophages was performed by Northern Blot analysis. Six millions J774 cells were plated in plastic petri dishes (100x200mm) (Falcon, Lincoln Park, NJ). After treatment, cells were lysed with Trizol reagent. Total RNA was isolated and separated in a 1.2% agarose gel containing 2.2 mol/l formaldehyde. The blots were prehybridized for 6h. The mRNA expression was analyzed by hybridization with [<sup>32</sup>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).

**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 probe for detection of 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 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).

**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<sub>2</sub>, 10 mmol/l HEPES, 0.1 % phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5% Nonidet-P-40 (NP-40)). After a 10-min incubation on ice, lysed cells were centrifuged, and the nuclei were washed with buffer A without NP-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  $-80^{\circ}\text{C}$ , and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assays were performed as previously described by Fried and Crothers (31). 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 % NP-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 (PAGE) containing 0.01% NP-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from murine macrophages with labeled DNA probe in the presence of a 1000-fold molar excess of unlabeled DNA probe.

#### **Determination of extracellular 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) (32). Extracellular LPL activity was determined using the Confluolip kit (Progen, Heidelberg, Germany) (33). Levels of macrophage LPL mass and activity were normalized to levels of total cell proteins.

**Western blot analysis for PKC isoforms**

After appropriate treatment, adherent J774 macrophages 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 ethylene glycol-bis tetraacetic acid (EGTA), 25  $\mu$ g/ml aprotinin, and 25  $\mu$ g/ml leupeptin). The membrane and cytosolic fractions were separated by ultracentrifugation (100,000 g for 30 minutes at 4°C). After recovery of high-speed supernatants containing cytosolic PKC, the corresponding membrane pellets were homogenized in 500  $\mu$ l of buffer A containing 0.5% Triton X-100. Protein extracts (10  $\mu$ g) were applied to 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad transfer blotting system at 100 V for 1h. Non-specific binding was blocked with 3% BSA for 1h at room temperature. After washing with PBS-Tween 0.1%, blots were incubated overnight with PKC- $\alpha$ , - $\beta$ <sub>I</sub>, - $\beta$ <sub>II</sub>, - $\gamma$ , - $\zeta$  and - $\epsilon$  or anti- $\beta$ -actin antibodies (Santa Cruz, CA). After further wash, membranes were incubated for 1h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse or anti-rabbit IgG (1/5000). Antigen detection was performed with an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham).

**Immunoprecipitation assay**

Following treatment with leptin,  $2 \times 10^6$  cells were washed twice with PBS and incubated for 1 h with methionine-free DMEM. Cells were then metabolically labeled with 100  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S] methionine for 30 min and chased for 1 h with complete DMEM. Radiolabeling was ended by the addition of lysis buffer (50 mmol/L Tris-



HCL [pH 7.5], 150 mmol/L NaCl, 100 µg/ml PMSF and 1% Triton X-100). Immunoprecipitation of LPL in cell lysates was performed after centrifugation of homogenates at 17,000g for 20 min at 4°C; the supernatant was collected and used for immunoprecipitation. The samples (200 µg total cytoplasmic proteins) were incubated at 4°C for 4 h with 10 µg of monoclonal anti-LPL antibody 5D2 (received from J.D. Brunzell, University of Washington, Seattle, WA) followed by incubation with 10 µl goat anti-mouse IgG antiserum (Bio Rad, Hercules, CA). The immunocomplexes were collected on protein A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz, CA), washed twice with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.2% NP-40, 2 mmol/L EDTA, and 500 mmol/L NaCl, then with TBS only. The pellet was resuspended in 1 x SDS-loading buffer (50 mmol/L Tris-HCl [pH 6.8], 100 mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 10% glycerol) and boiled for 10 min, and the samples were subjected to 8% SDS-PAGE. Immunoprecipitation of cytoplasmic proteins isolated from heparin-stimulated macrophages was used as a positive control. Immunoprecipitation with the irrelevant anti-mouse IgG (10 µg) (Santa Cruz, CA) was used as negative control. After autoradiography, the intensity of the bands was quantified by densitometry using an image analysis scanning system.

#### **Determination of cell viability**

Cell viability after treatment with leptin was assessed by trypan blue exclusion and was consistently found to be > 90%.

**Determination of total protein concentration**

Total protein content was estimated according to the Bradford method (34) using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada).

**Statistical analysis**

Statistical analysis of the results was done by one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons or by the unpaired Student's t-test. All values were expressed as means  $\pm$  SE.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Effect of leptin on human macrophage LPL secretion

Human monocyte-derived macrophages were incubated for 24 hours with increasing doses of leptin (1-10 nmol/l). At concentrations ranging from 2 to 10 nmol/l, leptin significantly increased extracellular LPL mass (Fig. 1A) and activity (Fig. 1B). Maximal effect was observed with 2 nmol/l leptin (LPL mass [% increase over control values]: leptin (2 nmol/l):  $154 \pm 9$ ,  $P < 0.001$ ); (LPL activity [% increase over control values]: leptin (2 nmol/l):  $137 \pm 12$ ,  $P < 0.001$ ). This stimulatory effect of leptin on human macrophage LPL mass and activity was still observed at 48 hours (LPL mass [% increase over control values]: leptin (2 nmol/l):  $126 \pm 7$ ,  $P < 0.05$ ); (LPL activity [% increase over control values]: leptin (2 nmol/l):  $124 \pm 9$ ,  $P < 0.05$ ).

### Effect of leptin on human macrophage LPL mRNA expression

To investigate whether leptin modulates macrophage LPL at the gene level, human monocyte-derived macrophages were incubated with leptin for 1 to 6 hours and LPL mRNA levels were determined by PCR analysis. Incubation of these cells for 1 and 3 hours, led to a significant increase in LPL mRNA levels. This effect was maximal at 1 hour, declining towards baseline at 6 hours (Fig. 2). Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of GAPDH, was observed. LPL mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA are presented in Fig. 2. (LPL mRNA levels [% increase over control values] 1 hour:  $152 \pm 15$ ,  $P < 0.01$ ; 3 hours:  $141 \pm 17$ ,  $P < 0.05$ ).

### **Leptin effect on human macrophage LPL secretion is mediated by the leptin (Ob-R) receptor**

To determine whether the Ob-R receptor is responsible for mediating the stimulatory effect of leptin on macrophage LPL secretion, human monocyte-derived macrophages were pretreated for 1 hour with saturating amounts (10 µg/ml) of a monoclonal antibody against the Ob-R receptor prior to the addition of leptin (2 nmol/l). Pretreatment of these cells with the anti-Ob-R receptor antibody resulted in a total inhibition of the stimulatory effect of leptin on macrophage extracellular LPL mass (Fig. 3A) and activity (Fig. 3B), whereas addition of the irrelevant murine anti-IgG<sub>1</sub> antibody did not affect these parameters.

### **Role of protein kinase C (PKC) and oxidative stress on leptin-stimulated human macrophage LPL secretion**

To evaluate the role of PKC in mediating leptin-induced macrophage LPL secretion, human monocyte-derived macrophages were preincubated for 1h with the pan specific PKC inhibitor, calphostin C (0.1 µg/ml). Pretreatment of the cells with this compound totally prevented the stimulatory effect of leptin on macrophage extracellular LPL mass (Fig. 4A) and activity (Fig. 4B). A similar effect was observed when human macrophages were pretreated with the conventional PKC selective inhibitor, GF109203X (20 nmol/l) (LPL mass [% increase over control values]: leptin: 156±4; GF109203X: 93±3; leptin + GF109203X: 100±3, P<0.01 versus leptin); (LPL activity [% increase over control values]: leptin: 133±2; GF109203X: 105±8; leptin + GF109203X: 88±5, P<0.01 versus leptin). The stimulatory effect of leptin on macrophage extracellular LPL mass and activity was

also completely abolished in the presence of the antioxidant NAC (10 mmol/l) (LPL mass [% increase over control values]: leptin: 153±5; NAC: 101±3; leptin + NAC: 100±2, P<0.01 versus leptin); (LPL activity [% increase over control values]: leptin: 132±3; NAC: 97±5; leptin + NAC: 90±3, P<0.01 versus leptin).

### **Effect of leptin on murine macrophage LPL secretion and gene expression.**

#### **Role of oxidative stress and PKC.**

Given the limited amount of biological material that can be obtained from human macrophages, the molecular mechanisms involved in leptin-induced LPL expression were studied in the J774 murine macrophage cell line. To ascertain the validity of this model, LPL secretion and gene expression were first measured in leptin-treated J774 macrophages. Incubation of murine macrophages with leptin led to a significant increase in LPL secretion by these cells. Maximal stimulatory effect of leptin on extracellular LPL mass was observed after a 24 hours incubation period with 4 nmol/l of leptin. This effect was abolished by the Ob-R antibody (10 µg/ml) (LPL mass [% increase over control values]: leptin (4 nmol/L): 175±12, P<0.001; leptin + Ob-R antibody: 104±8, P<0.01 versus leptin; leptin + IgG<sub>1</sub> antibody: 184±23). Leptin (4 nmol/l) also significantly increased murine macrophage LPL mRNA levels. This effect was maximal at 1 hour, declining towards baseline at 6 hours (LPL mRNA levels [% increase over control values] 1 hour: 176±20, P<0.05; 3 hours: 128±3, P<0.001). Pretreatment of J774 macrophages with NAC (10 mmol/L) or GF109203X (20 nmol/L) abolished the stimulatory effect of leptin on macrophage LPL gene expression (Fig. 5).

While incubation of J774 cells for 1 hour with PMA (500 nmol/l) but not with the non active analogue of PMA, 4 $\alpha$ -PMA, increased LPL mRNA levels (LPL mRNA levels [% increase over control values] PMA: 292 $\pm$ 52, P<0.01; 4 $\alpha$ -PMA: 106 $\pm$ 19), endogenous PKC depletion by overnight PMA treatment totally abolished the stimulatory effect of leptin on macrophage LPL expression (LPL mass [% increase over control values]: leptin: 103 $\pm$ 5); (LPL activity [% increase over control values]: leptin: 98 $\pm$ 6) and PKC- $\beta$  expression (data not shown).

As illustrated in Fig. 6, treatment of J774 cells for 20 min with 4 nmol/l leptin or PMA, used in these experiments as positive control, increased the expression of PKC- $\alpha$ , - $\beta$ <sub>I</sub>, - $\beta$ <sub>II</sub> and - $\gamma$  by 2.2-, 5.8-, 4.2- and 5.5- fold, respectively. Conversely, the expression of PKC- $\zeta$  and PKC- $\epsilon$  was not enhanced by leptin (data not shown). Under these experimental conditions, no modulation of  $\beta$ -actin, used as internal control, was observed.

To evaluate whether other signaling pathways that are known to be activated by leptin might be involved in the stimulatory effect of leptin of macrophage LPL expression, J774 cells were incubated with leptin in the presence or absence of the PI3 Kinase inhibitor, wortmannin (100  $\mu$ mol/l) or the MAPK inhibitor, PD98059 (50  $\mu$ mol/l). Exposure of macrophages to these inhibitors did not reduce the stimulatory effect of leptin on macrophage LPL secretion (LPL mass [% increase over control values]: leptin: 175 $\pm$ 12, P<0.001; leptin + wortmannin: 185 $\pm$ 67; leptin + PD98059: 201 $\pm$ 43).

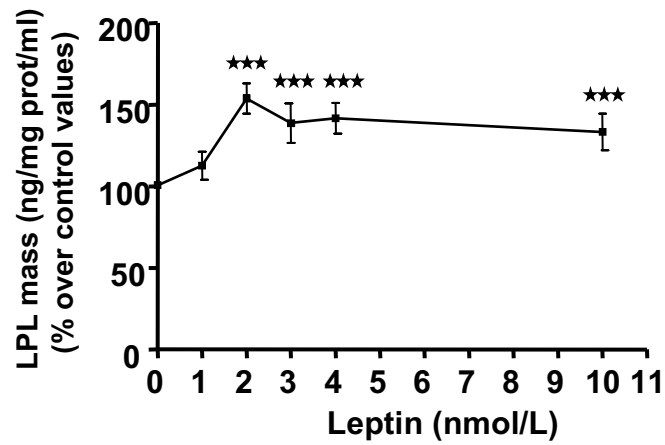
**Effect of leptin on murine macrophage LPL synthetic rate**

To determine the effect of leptin on macrophage LPL synthesis, J774 cells were treated for 24 hours with leptin (4 nmol/l) and then pulse-labeled. Cell extracts were immunoprecipitated to obtain the radiolabeled LPL protein. Heparin-stimulated cells and immunoprecipitation with an irrelevant antibody were used as positive and negative controls, respectively. As shown in Fig. 7, leptin led to a significant increase in macrophage LPL synthetic rate. (LPL synthetic rate [% increase over control values]: leptin (4 nmol/l):  $166 \pm 18$ ,  $P < 0.01$ ).

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

To test whether incubation of J774 cells in the presence of leptin results in changes at the level of LPL gene binding proteins, we measured the binding activity of nuclear proteins extracted from leptin-treated J774 cells to the AP-1 consensus sequence of the LPL gene promoter. Electrophoretic mobility shift experiments showed that a 45 min exposure of J774 cells to leptin led to a considerable increase in the binding of nuclear proteins to the AP-1 consensus sequence of the LPL gene promoter. This binding complex was specifically competed in the presence of a 1,000-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide. Pretreatment of the cells with GF109203X abolished the stimulatory effect of leptin on the binding of nuclear proteins to the AP-1 sequence of the LPL gene promoter. In contrast, no effect of PI3 Kinase and MAPK inhibitors on leptin-induced AP-1 activation was observed (Fig. 8).

A)



B)

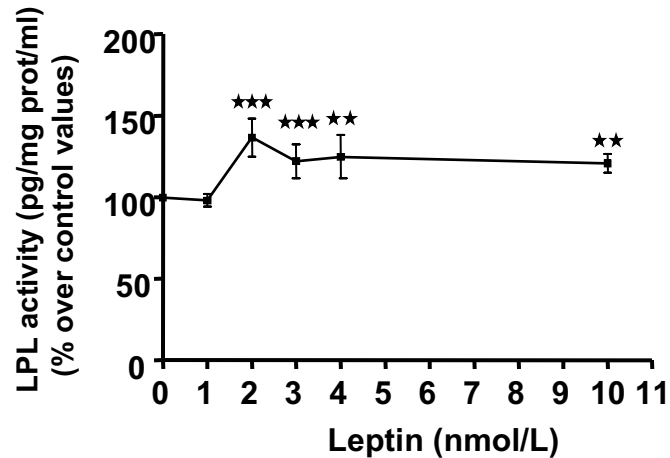


Fig. 1. Dose-dependent effect of leptin on human macrophage extracellular LPL immunoreactive mass (A) and activity (B). Human macrophages were incubated for 24 hours with increasing doses of leptin (1-10 nmol/l). LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) were measured in the culture medium and normalized to total cell protein levels. Data are means  $\pm$  SE of 4 different experiments, \*\* $P$ <0.01 vs. medium (Med), \*\*\* $P$ <0.001 vs. medium (Med).



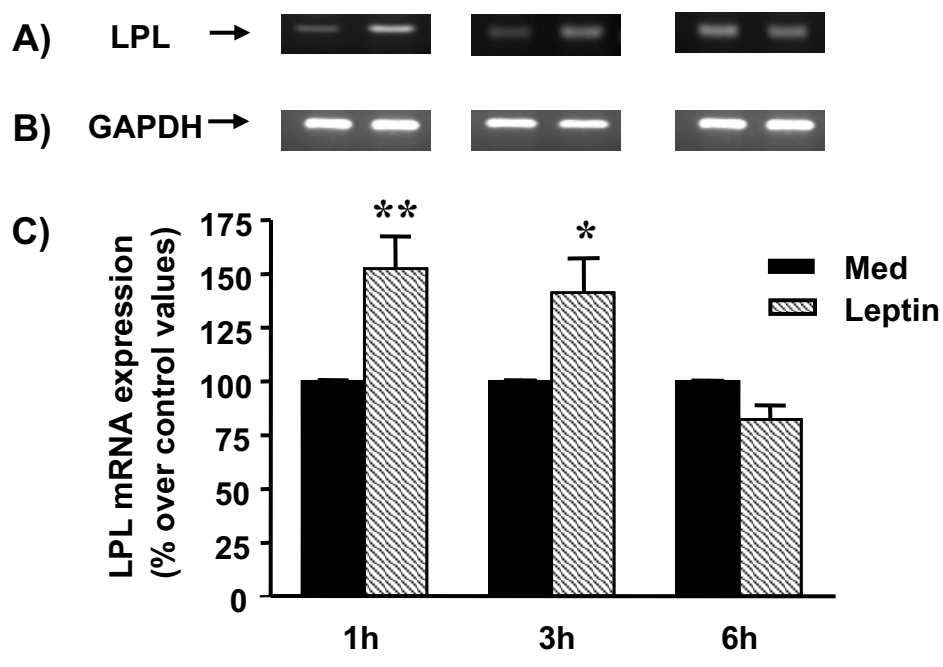


Fig. 2. Effect of leptin on human macrophage LPL mRNA expression. Human macrophages were incubated for 1, 3 and 6 hours in the presence of 10 nmol/l leptin. At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analysed by PCR analysis for LPL (A) and GAPDH (B) mRNA expression. Levels of LPL mRNA were normalized to the levels of GAPDH mRNA (C). Results are means  $\pm$  SE of 4 different experiments, \* $P$ <0.05 vs medium (Med), \*\* $P$ <0.01 vs. medium (Med).

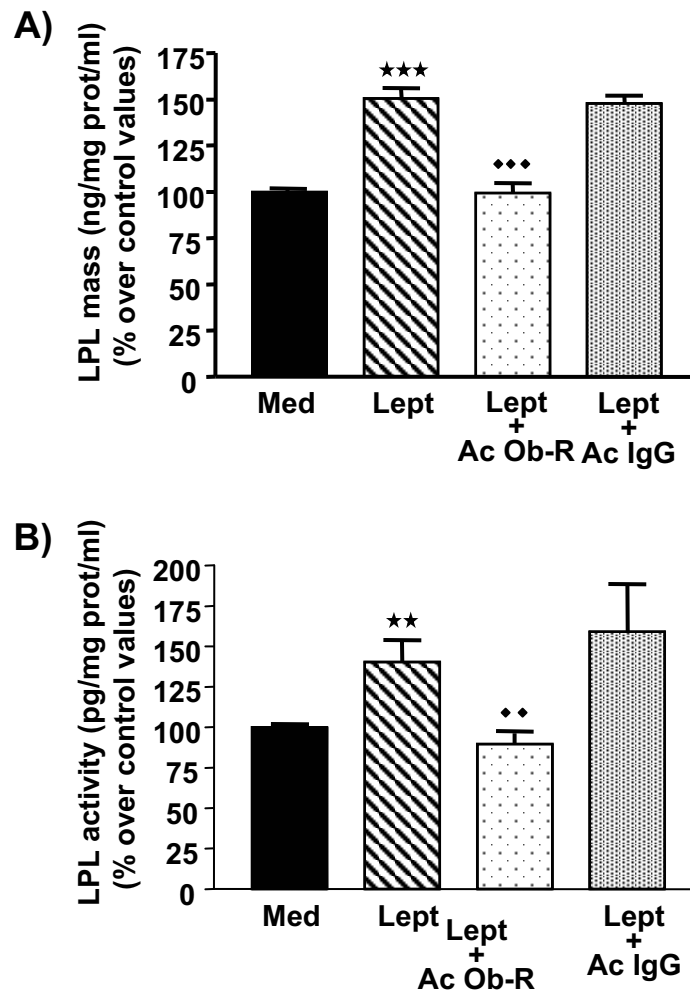


Fig. 3. Effect of Ob-R antibody on human macrophage extracellular LPL immunoreactive mass (A) and activity (B). Human macrophages were preincubated for 1 hour with saturating amounts of an anti-Ob-R receptor antibody (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or anti-IgG1 neutralizing antibody prior to incubation with 2 nmol/l leptin for 24 hours. At the end of this incubation period, LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) were measured in the culture medium and normalized to total cell protein levels. Data are means  $\pm$  SE of 4 different experiments, \*\* $P < 0.01$  vs. medium (Med), \*\*\* $P < 0.001$  vs. medium (Med), ◆◆ $P < 0.01$  vs. leptin, ◆◆◆ $P < 0.001$  vs. leptin.

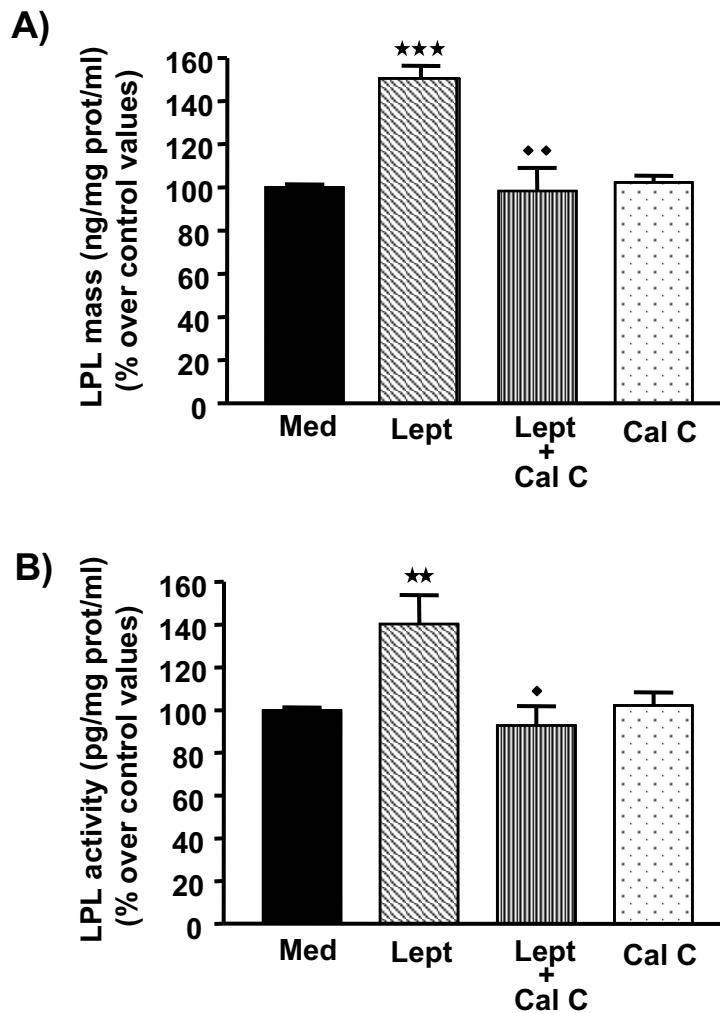


Fig. 4. Effect of PKC inhibitor on human macrophage extracellular LPL immunoreactive mass (A) and activity (B). Human macrophages were preincubated for 1 hour with calphostin C (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) prior to incubation with 2 nmol/l leptin for 24 hours. At the end of this incubation period, LPL immunoreactive mass (A) and activity (B) were measured in the culture medium and normalized to total cell protein levels. Data are means  $\pm$  SE of 4 different experiments, \*\* $P < 0.01$  vs. medium (Med), \*\*\* $P < 0.001$  vs. medium (Med), ♦ $P < 0.05$  vs. leptin, ♦♦ $P < 0.01$  vs. leptin.

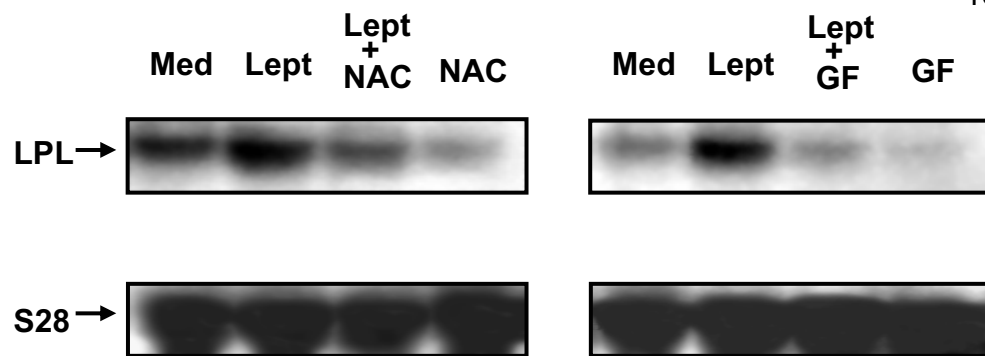


Fig. 5. Effect of antioxidant and PKC inhibitor on leptin-stimulated murine macrophage LPL gene expression. J774 cells were pre-incubated for 1 hour in the presence of N-acetylcysteine (NAC) (10 mmol/l) or GF109203X (20 nmol/l), then treated for 1 hour with 4 nmol/l leptin. At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL (upper panel) and S28 (lower panel) mRNA expression. Representative blots from 3 independent experiments are shown.

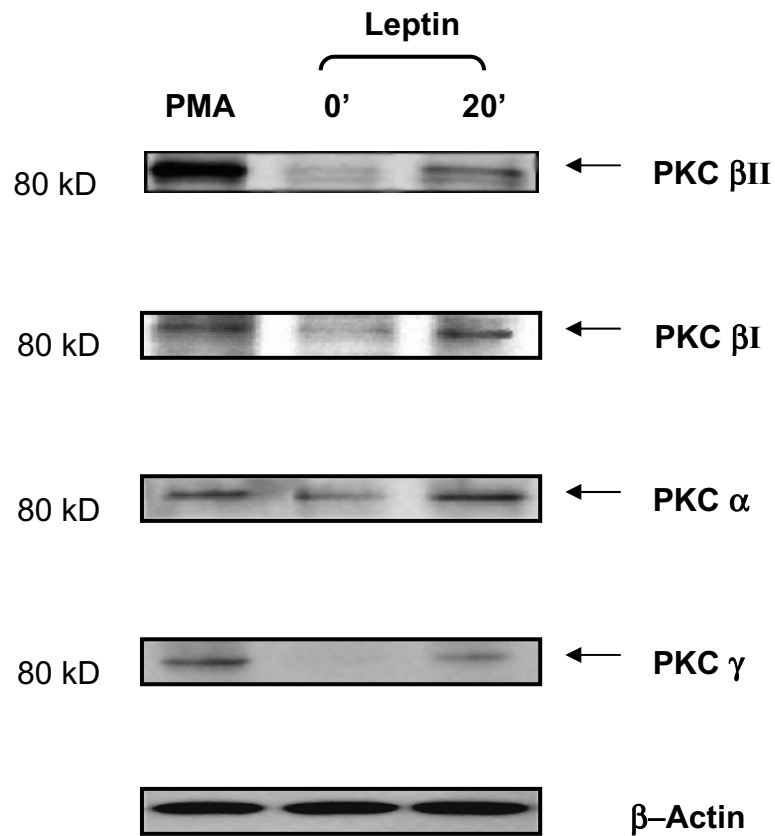


Fig. 6. Effect of leptin on conventional PKC isoform expression. J774 cells were incubated with 4 nmol/l leptin for 20 min. Membrane fractions were assayed for conventional PKC isoforms by Western blot analysis as described in *Methods*. Cells stimulated with PMA (500 nmol/l) for 30 min were used as positive control. Figure illustrates the results of one representative experiment out of 3.

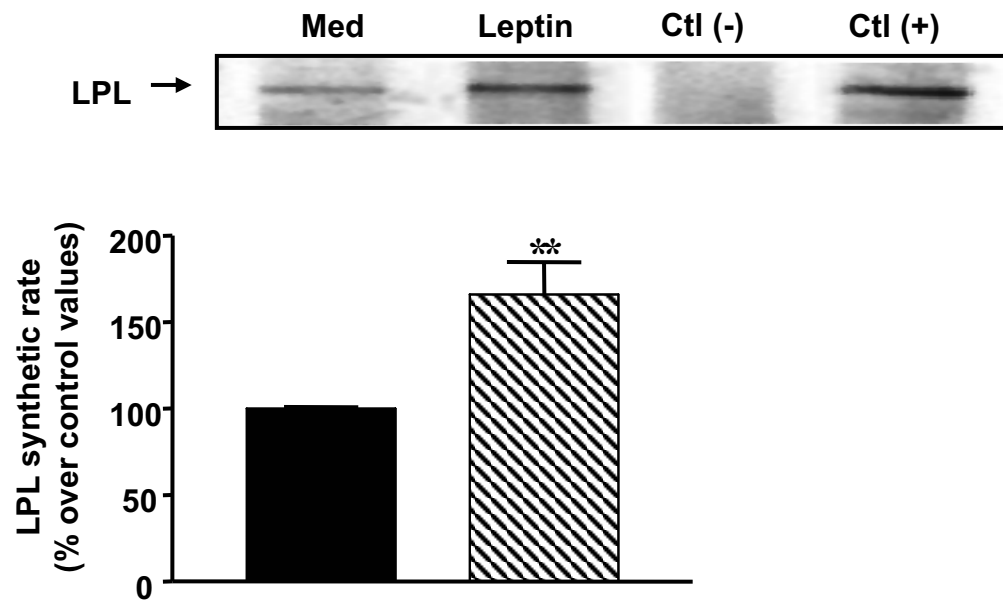


Fig. 7. Effect of leptin on murine macrophage LPL synthetic rate. J774 cells were incubated for 24 hours with 4 nmol/l leptin and then incubated for 1 hour with methionine-free medium. Cells were next labelled with [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine for 30 min and chased for 1 hour with complete DMEM. LPL was immunoprecipitated by incubating total cytoplasmic proteins with 10  $\mu\text{g}$  of the monoclonal anti-LPL antibody 5D2. Heparin-stimulated cells and immunoprecipitation with an irrelevant antibody (IgG), were used as positive and negative controls, respectively. Data are means  $\pm$  SE of 4 different experiments, \*\* $P < 0.01$  vs. medium (Med).

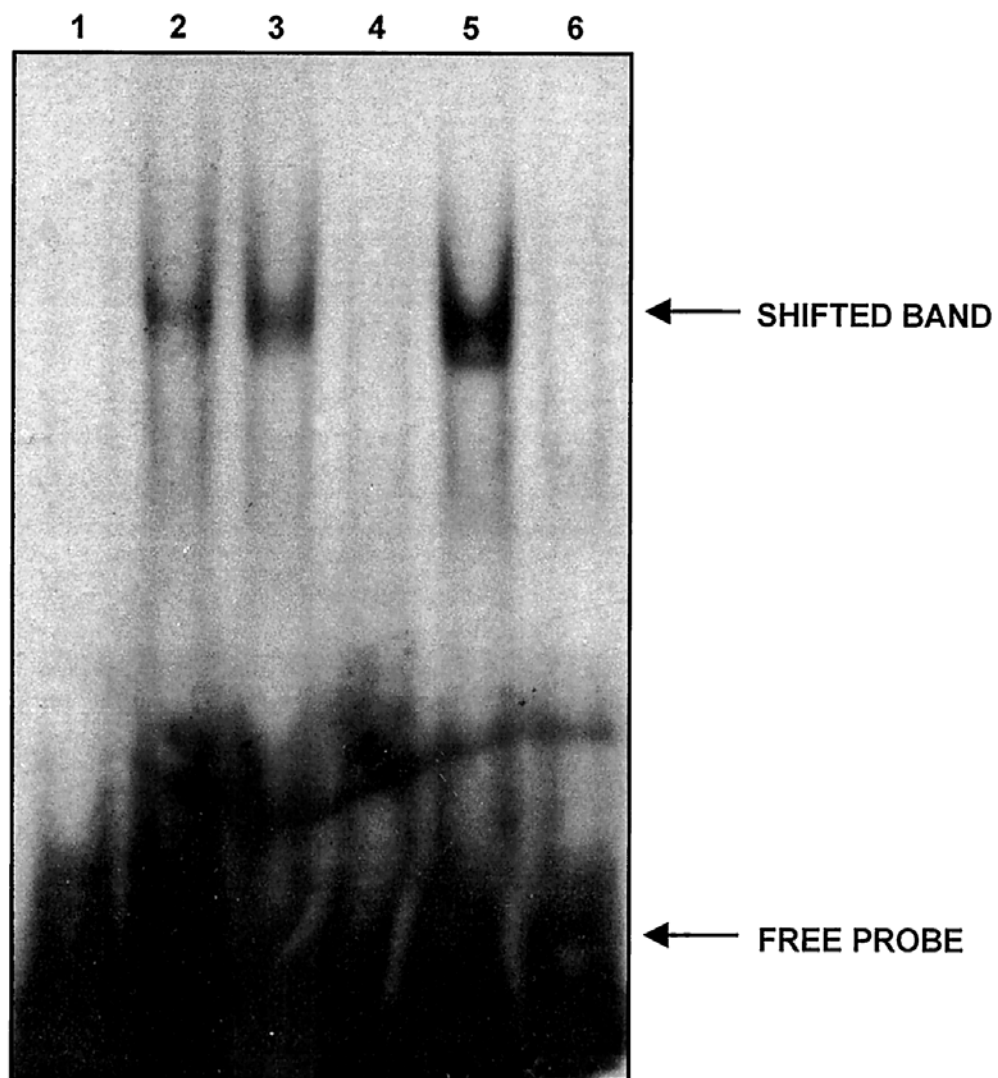


Fig. 8. Effect of leptin on the binding of nuclear proteins extracted from murine macrophages to the regulatory AP-1 sequence of the LPL gene promoter. J774 cells were incubated with 4 nmol/l leptin for 45 minutes in the presence or absence of PD98059 (50  $\mu$ mol/l), GF109203X (20 nmol/l) or wortmannin (100  $\mu$ mol/l). 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% PAGE. Figure shows one representative experiment out of three. Lane 1: untreated cells; lane 2: leptin-treated cells; lane 3: leptin + PD98059; lane 4: leptin + GF109203X; lane 5: leptin + wortmannin; lane 6: competition of the leptin-induced binding complex in the presence of 1000-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide.



## DISCUSSION

Immune cells and especially macrophages play a crucial role in the development and progression of atherosclerotic lesions (35). Among the multiple molecules secreted by macrophages in the arterial wall, LPL has unique features in that it influences atherogenesis by a dual effect, namely a peripheral effect whereby it affects the composition of plasma lipoproteins and a local vascular effect whereby it favors foam cell formation and atherosclerosis in vivo (16,17,21,36,37).

Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of death and the major complication of diabetes (38,39). Several cardiovascular risk factors, including hyperglycemia, glycoxidative modifications of lipoproteins and advanced glycation end products, have been identified in patients with diabetes. Evidence that leptin is enhanced in the plasma of patients with diabetes (3) and promotes inflammation (5-7) supports the possibility that leptin may represent one of such factors. Consistent with this hypothesis, the present study demonstrates that leptin stimulates the secretion of macrophage LPL in vitro. In accordance with one previous study using preadipocytes (40), we found that leptin enhances LPL gene expression in macrophages. Although we did not perform run-on assays, our data showing that induction of LPL mRNA levels by leptin parallels the increase in LPL synthesis and secretion, suggest that macrophage LPL regulation in response to leptin takes place at the transcriptional level. This possibility is further supported by our results demonstrating a stimulatory effect of leptin on nuclear protein binding to the AP-1 sequence of the LPL gene. Macrophages possess the molecular

machinery required to respond to leptin stimulation. Indeed, these cells express high levels of the long form of the leptin receptor and their stimulation with physiological concentrations of leptin results in the activation of intracellular signaling pathways linked to this receptor (7,41). Evidence that the Ob-R receptor antibody inhibits the induction of macrophage LPL by leptin demonstrates that this hormone regulates macrophage LPL through its functional receptors. Our findings that NAC prevented the stimulatory effect of leptin on macrophage LPL further indicate that leptin stimulates macrophage LPL through an oxidative stress-dependent pathway. This observation is consistent with previous results showing that reactive oxygen species are effective enhancers of macrophage LPL expression (42) and that leptin induces oxidative stress in human endothelial cells (9,10).

PKC is implicated in the pathogenesis of vasculopathies associated with diabetes and preferential activation of the conventional PKC isoforms is documented in diabetic vascular tissues (43,44). In accordance with the results of Takekoshi et al in chromaffin cells (45), we found that leptin enhances the expression of PKC  $-\alpha$ ,  $-\beta_1$ ,  $-\beta_{II}$ , and  $-\gamma$  in macrophages. To the best of our knowledge, this is the first report that leptin activates PKC in vascular cells. Evidence that the conventional PKC selective inhibitor, GF109203X, abrogates the effect of leptin on macrophage LPL expression further stresses the key role of the conventional PKC isoenzymes in the regulation of macrophage LPL by leptin. Previous studies have demonstrated that PKC is involved in AP-1 activation (46)

and that leptin stimulates c-fos expression (40). On the basis of these results, it is tempting to postulate that activation of PKC by leptin that we documented in the present study could result in the binding of its downstream target, c-fos to the AP-1 sequence of the LPL gene promoter, leading thereby to an increased transcription rate of this gene. This possibility is supported by our results showing that GF109203X inhibits the stimulatory effect of leptin on the binding of nuclear proteins to the AP-1 regulatory sequence of the LPL gene. Besides PKC and AP-1, leptin activates in mononuclear cells other signaling pathways including phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (47,48) and increases the expression of peroxisome proliferator -activated receptors (PPARs) (40). Evidence that insulin, a well known activator of PI3K and MAPK, does not enhance human macrophage LPL (unpublished observations) and that PI3K and MAPK inhibitors do not inhibit the stimulatory effect of leptin on macrophage LPL secretion do not argue for a role of these kinases in leptin-induced macrophage LPL expression. Furthermore, our results showing that leptin does not affect PPAR activation in human macrophages do not support the involvement of PPARs in the regulation of the macrophage LPL gene by leptin.

Evidence has been provided that LPL secreted in the vessel wall exerts pro-atherogenic effects through both its structural and catalytic properties. Our results showing that leptin, at concentrations similar to those found in the plasma of diabetic patients, stimulates the release of increased amounts of active macrophage LPL suggest that the effect of leptin on macrophage LPL may promote atherogenesis in diabetes. In support for this possibility, O' Rourke et al

recently reported that under hyperglycemic conditions, leptin significantly reduced the level of hormone-sensitive lipase in J774 macrophages (49). Establishing whether the in vivo effect of leptin on macrophage function favors atherogenesis in humans is of clinical interest especially in patients with diabetes who have increased plasma levels of leptin and demonstrate enhanced secretion of pro-atherogenic cytokines by macrophages, including  $\text{TNF}\alpha$  and LPL (25).

**REFERENCES**

1. Ostlund RE Jr, Wang JW, Klein S: Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3909-3013, 1996
2. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF: Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Engl J Med* 334:292-295, 1996
3. Nyholm B, Fisker S, Lund S, Moller N, Schmitz O: Increased circulating leptin concentrations in insulin-resistant first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: relationship to body composition and insulin sensitivity but not to family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 136:173-179, 1997
4. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA: Leptin : a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-1433, 2002
5. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V: Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 194:6-11, 1999
6. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM: Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12:57-65, 1998

7. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ: Leptin can induce proliferation, differentiation and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14564-14568, 1996
8. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR: Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686, 1998
9. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R: Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13:1231-1238, 1999
10. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M: Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276:25096-25100, 2001
11. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL: Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target for leptin. *Circ Res* 88:954-960, 2001
12. Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I: Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 48:426-429, 1999
13. Kang SM, Kwon HM, Hong BK, Kim D, Kim IJ, Choi EY, Jang Y, Kim HS, Kim MS, Kwon HC: Expression of leptin receptor (Ob-R) in human atherosclerotic lesions: potential role in intimal neovascularization. *Yonsei Med J* 41:68-75, 2000

14. Ciccone M, Vettor R, Pannacciulli N, Minenna A, Bellacicco M, Rizzon P, Giorgino R, De Pergola G: Plasma leptin is independently associated with the intima-media thickness of the common carotid artery. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:805-810, 2001
15. Soderberg S, Ahren B, Stegmayr B, Johnson O, Wiklund PG, Weinehall L, Hallmans G, Olsson T: Leptin is a risk marker for first-ever hemorrhagic stroke in a population-based cohort. *Stroke* 30:328-337, 1999
16. Clee SM, Bissada N, Miao F, Miao L, Marais AD, Henderson HE, Steures P, McManus J, McManus B, LeBoeuf RC, Kastelein JJP, Hayden MR: Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J Lipid Res* 41:521-531, 2000
17. Mead JR, Cryer A, Ramji DP: Lipoprotein lipase, a key role in atherogenesis? *FEBS Letters* 462:1-6, 1999
18. 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
19. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G: Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 38:1722-1729, 1997
20. 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

21. 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
22. 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
23. 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
24. Mamputu JC, Renier G: Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2212-2219, 2000
25. Sartippour MR, Renier G: Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: Role of peripheral factors. *Diabetes* 49:597-602, 2000
26. 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
27. Michaud SE, Renier G: Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase. Potential role of PPARs. *Diabetes* 50:660-666, 2001



28. Beauchamp MC, Renier G: Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes* 51:1181-1187, 2002
29. Mentzer SJ, Guyre PM, Burakoff SJ, Faller DV: Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol* 101:312-319, 1986
30. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
31. Fried M, Crothers DM: Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9:6505-6525, 1981
32. 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 enzyme. *J Lipid Res* 31:1911-1924, 1990
33. 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
34. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
35. Ross R: Mechanisms of disease: Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999

36. Van Eck M, Zimmermann R, Groot PHE, Zechner R, Van Berkel TJC: Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:e53-e62, 2000
37. Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MF: Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *J Biol Chem* 275:26293-26299, 2000
38. Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H: Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall Study. *Lancet* 1:1373-1376, 1980
39. Pyorala K: Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two population studies in Finland. *Diabetes Care* 2:131-141, 1979
40. Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y: Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro : activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C853-C863, 2002
41. O'Rourke L, Yeaman SJ, Shepherd PR: Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes* 50:955-961, 2001
42. Renier G, Desfaits AC, Lambert A, Mikhail R: Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J Lipid Res* 47:799-809, 1996

43. Idris I, Gray S, Donnely R: Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 44:659-673, 2001
44. Way KJ, Katai N, King GL: Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 18:945-959, 2001
45. Takekoshi K, Ishii K, Nanmoku T, Shibuya S, Kawakami Y, Isobe K, Nakai T: Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology* 142:4861-4871, 2001
46. Genot EM, Parker PJ, Cantrell DA: Analysis of the role of protein kinase C- $\alpha$ , - $\epsilon$ , and - $\zeta$  in T cell activation. *J Biol Chem* 270:9833-9839, 1995
47. van den Brink GR, O'Toole T, Hardwick JC, van den Boogaardt DE, Versteeg HH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP: Leptin signalling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:144-150, 2000
48. Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V: Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 212:83-91, 2001
49. O'Rourke L, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR: Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem* 277:42557-42662, 2002

## **II.2 Deuxième article**

*Diabetes* 54: 1506-1513, 2005

**LINOLEIC ACID INCREASES LECTIN-LIKE OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-1 (LOX-1) EXPRESSION IN HUMAN AORTIC ENDOTHELIAL CELLS.**

Fritz Maingrette<sup>1</sup> and Geneviève Renier<sup>2</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Nutrition and <sup>2</sup>Department of Medicine, University of Montreal, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

Keywords: Fatty acids, endothelial dysfunction, diabetes, LOX-1, atherosclerosis.

Word count:

Address correspondence and reprint requests to:

Dr Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
CHUM Research Centre  
3<sup>rd</sup> floor, Y-3622  
1560 Sherbrooke East  
Montreal, Quebec, Canada, H2L 4M1  
E-mail: [genevieve.renier@umontreal.ca](mailto:genevieve.renier@umontreal.ca)

## SUMMARY

Results from in vitro studies suggest that selected fatty acids, and especially linoleic acid (LA), can elicit endothelial dysfunction (ED). Since LA is increased in all low density lipoprotein (LDL) subfractions in patients with type 2 diabetes, this alteration may contribute to ED associated with diabetes. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) is the major endothelial receptor for oxidized LDL (oxLDL) and uptake of oxLDL through LOX-1 induces ED. To evaluate whether LA may contribute to the upregulation of endothelial LOX-1 in diabetes, we studied the effect of LA on LOX-1 expression in cultured human aortic endothelial cells (HAECs). Treatment of HAECs with LA increased, in a time- and dose-dependent manner, endothelial LOX-1 protein expression. Pretreatment of HAECs with antioxidants and inhibitors of NADPH oxidase, protein kinase C (PKC) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inhibited the stimulatory effect of LA on LOX-1 protein expression. Furthermore, in LA-treated HAECs, increased expression of classic PKC isoforms was observed. LA also led to a significant increase in LOX-1 gene expression and enhanced the binding of nuclear proteins extracted from HAECs to the NF- $\kappa$ B regulatory element of the LOX-1 gene promoter. Finally, LA enhanced, through LOX-1, oxLDL uptake by endothelial cells. Overall, these results demonstrate that LA enhances endothelial LOX-1 expression through oxidative stress-sensitive- and PKC-dependent pathways. This effect seems to be exerted at the transcriptional level and to involve the activation of NF- $\kappa$ B. Upregulation of LOX-1 by LA may contribute to ED associated with type 2 diabetes.

## INTRODUCTION

Endothelial dysfunction (ED), a characteristic feature of early-state atherosclerosis, is well documented in patients with diabetes, individuals with insulin resistance or at high risk for developing type 2 diabetes (1;2). Critical factors which may induce activation and injury to the endothelium in the diabetic state include oxidized LDL (oxLDL) (3) and selected unsaturated fatty acids, such as linoleic acid (LA) (4). One potential key determinant of oxLDL-induced ED is lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), a newly identified limiting factor for oxLDL uptake by endothelial cells (5). Data showing that LOX-1 expression is enhanced by proatherogenic factors relevant to human diabetes, including oxLDL (6), high glucose (7), advanced glycation end products (AGEs) (8), and C-reactive protein (CRP) (9) and is upregulated in endothelium and aortas of diabetic animals (8) support a role of this receptor in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. Substantial amounts of data have been accumulated to show that LA is a pro-oxidative and proinflammatory molecule (10-12) that can induce endothelial cell activation and dysfunction. These data and the observation that patients with type 2 diabetes show increased concentrations of LA in all low density lipoprotein (LDL) subfractions (13) support the significance of this fatty acid in ED associated with diabetes. In the present study, we investigated the role of LA in the regulation of endothelial LOX-1, the molecular mechanisms involved in this effect and the role of LOX-1 in LA-induced oxLDL uptake by endothelial cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Wisent (St. Bruno, Quebec, Canada). Hank's balanced salt solution (HBSS), penicillin-streptomycin, glycine, sodium dodecyl sulfate (SDS) and Trizol reagent were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Human aortic endothelial cells (HAECs), endothelial growth culture medium (EGM) and EGM bullet kit were obtained from Cedarlane Laboratories Limited (Hornby, Ontario, Canada). RPMI-1640 was obtained from Gibco BRL (Grand Island, NY). Sodium salt LA, fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) fraction V, isopropanol, vitamin C and monoclonal antibody against  $\beta$ -actin were purchased from Sigma (St.Louis, MO). Ficoll and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG were obtained from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England). Monoclonal antibodies against LOX-1, p50, p65, PKC- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_{II}$  and - $\gamma$  were bought from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). IgG<sub>1</sub> neutralizing antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Calphostin C, GF109203X, BAY11-7085, N-acetylcysteine (NAC), curcumin, apocynin, thenoyltrifluoroacetone (TTFA), Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) (MnTBAP) and diphenyleneiodonium chloride (DPI) were obtained from Calbiochem (La Jolla, Ca).



## **Cells**

Commercially available HAECs (passage 3) were grown to confluence in EGM under recommended conditions. The EGM was supplemented with 10% FCS containing 0.01 µg/ml human epidermal growth factor, 0.1% gentamicin sulfate amphotericin-B, 1 µg/ml hydrocortisone and 12 µg/ml bovine brain extract protein content. Cells were used at passages 3 to 5. Evidence that these cells express Von Willebrand factor, adhesion molecules, and cytokines and demonstrate plasminogen activator inhibitor-1 activity supports their relevance as model for the study of native vascular endothelium. Confluent HAECs were incubated for different time periods in serum-free EBM supplemented with 1% penicillin-streptomycin in the presence of 0.2 mmol/l LA bound to 2% BSA. Serum-free EBM supplemented with 2% BSA was used as control. Under these experimental conditions, the FA-to-albumin molar ratio was ~1, a value that is within physiological levels.

## **Analysis of mRNA expression**

Expression of LOX-1 gene in human HAECs was measured by polymerase chain reaction (PCR) technique. Total RNA for use in the PCR reaction was extracted from cells by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski and Sacchi. 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 total cellular RNA with 0.1 µg oligodT (Pharmacia) for 5 min at 98°C then by incubating the mixture with reverse

transcription buffer for 1h at 37°C. The cDNA obtained was amplified by using 0.8  $\mu\text{mol/L}$  of two synthetic primers specific for human LOX-1 (5'-TTACTCTCCATGGTGGTGGTGCC-3') (5'-AGCTTCTTCTGCTTGTTGCC-3') and human  $\beta$ -actin (5'-TCGAATTCTGAGAAGAGCTATGAGCTGCCG-3') (5'-TCGCATCCGTGCCACCAGACAGCACTGTGTTG-3') used as the internal standard in the PCR reaction mixture. A 193-base pair human LOX-1 cDNA fragment and a 201-base pair human  $\beta$ -actin cDNA fragment were amplified enzymatically by 40 and 20 repeated cycles, respectively. An aliquot of each reaction mixture was then subjected to electrophoresis on 1% agarose gel containing ethidium bromide. The intensity of the bands was measured by an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000, Packard Instrument Company). Titrating the cDNA samples ensured that the signal lies on the exponential part of the standard curve.

### **Western blot**

HAEC protein extracts (8  $\mu\text{g}$ ) were applied to 10% SDS-polyacrylamide gel (PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad transfer blotting system at 100 V for 1h. Non-specific binding was blocked with 5% milk for 1h at room temperature. After washing with phosphate buffered saline (PBS)-Tween 0.1%, blots were incubated overnight at 4°C with anti-LOX-1 or anti- $\beta$ -actin antibodies. After further wash, membranes were incubated for 1h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG

(1/5000). Antigen detection was performed with an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham).

For PKC isoforms analysis, HAECs 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 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 0.5 mmol/l ethylene glycol-bis tetraacetic acid (EGTA), 25  $\mu$ g/ml aprotinin, and 25  $\mu$ g/ml leupeptin). The membrane and cytosolic fractions were separated by ultracentrifugation (100,000 g for 30 minutes at 4°C). After recovery of high-speed supernatants containing cytosolic PKC, the corresponding membrane pellets were homogenized in 500  $\mu$ l of buffer A containing 0.5% Triton X-100 and assayed for classic PKC isoforms by Western blot analysis.

#### **Uptake of DiI-oxLDL**

Native LDL (density, 1.019 to 1.063) was isolated from plasma obtained from healthy donors by sequential ultracentrifugation using potassium bromide for density adjustment. Native LDL was extensively dialyzed for 24 hours at 4°C against 5 mmol/L Tris/50 nmol/L NaCl to remove EDTA. 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled oxLDL (DiI-OxLDL) was obtained from Biomedical Technologies (Stoughton, MA). To examine cellular uptake of oxLDL, HAECs were seeded in 8-well cultureslides (Falcon<sup>®</sup>) and incubated for 3 hours in medium containing 5% of lipoprotein-deficient serum with DiI-labeled oxLDL (80  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of a 500-fold excess of unlabeled oxLDL. At the end of the incubation period, cells were washed, mounted on

coverslips with mounting medium and examined by fluorescence microscopy. To measure amounts of DiI-oxLDL accumulated in cells, HAECs were seeded in 12-well plates receiving the same treatment as mentioned above. At the end of the incubation period, DiI was extracted by isopropanol and the fluorescence was determined at 520/564 nm. Results were normalized to total cell protein concentrations (Bradford).

### **DNA binding assay**

The isolation of the nuclei was performed as follows. Briefly,  $5 \times 10^7$  HAECs cells were washed and collected with 10 ml ice-cold PBS/phosphatase inhibitor buffer (125 mmol/l sodium fluoride (NaF), 250 mmol/l  $\beta$ -glycerophosphate, 250 mmol/l para-nitrophenyl phosphate, 25 mmol/l sodium orthovanadate). The cells were transferred to a pre-chilled 15 ml tube and centrifuged at 3000 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 ml of ice-cold hypotonic buffer (20 mmol/l HEPES, pH 7.5, 5 mmol/l NaF, 10  $\mu$ mol/l sodium molybdate, 0.1 mmol/l EDTA). After a 15-min incubation on ice, 50  $\mu$ l Nonidet-P40 (NP-40) (10%) was added and the homogenate was mixed and centrifuged for 30 sec at 4°C in a microcentrifuge. The nuclear pellet was resuspended in 50  $\mu$ l lysis buffer (1 mmol/l dithiothreitol (DTT), 2 mol/l potassium chloride, 25 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l EDTA, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 2 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride) and rocked on ice for 30 min. Nuclei were collected by centrifugation for 20 min at 13,000 rpm. Aliquots (50  $\mu$ l) of the supernatants were frozen at -80°C, and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assays were performed as follows.

Briefly, 5 µg 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 sodium chloride, 0.25 % NP-40, and 5 mmol/l DTT). End-labeled double-stranded consensus sequences of the LOX-1 promoter NF-κB-enhancing elements (20,000 cpm per sample) were then added to the samples for 30 min. Samples were analyzed on a 4 % PAGE containing 0.01% NP-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from HAECs with labeled DNA probe in the presence of a 1000-fold molar excess of unlabeled DNA probe.

#### **DNA probes**

Double-stranded oligonucleotides containing the NF-κB (5'-CGTCTGCCCTTTCCCCCTCT-3 and 5'-GAGAAGAGGGGGAAAGG-3) consensus sequence of the human LOX-1 gene promoter (14) were synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer. After annealing, the oligonucleotides were labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP using the Boehringer Mannheim 5' end-labeling kit (Indianapolis, IN).

#### **Determination of cell viability**

Cell viability after treatment with LA was assessed by trypan blue exclusion and was consistently found to be > 80%.

#### **Determination of total protein concentration**

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

**Statistical Analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### **Effect of LA on endothelial LOX-1 mRNA expression**

Treatment of HAECs for 15 to 24 hours with 0.2 mmol/l LA significantly increased LOX-1 mRNA levels (LOX-1 mRNA levels [% increase over control values] 15 hours:  $161 \pm 13$ ,  $P < 0.001$ ; 18 hours:  $178 \pm 40$ ,  $P < 0.01$ ; 24 hours:  $187 \pm 19$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig.1A). Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of  $\beta$ -actin was observed (Fig.1B). LOX-1 mRNA levels normalized to the levels of  $\beta$ -actin mRNA are presented in Fig.1C.

**Effect of LA on endothelial LOX-1 protein expression** To determine whether the increased LOX-1 mRNA expression induced by LA resulted in enhanced protein expression, HAECs were treated with 0.2 mmol/l LA for 6 to 48 hours and LOX-1 protein expression was determined by Western blot analysis. Exposure of HAECs for 15 to 48 hours to LA significantly increased LOX-1 protein levels (Fig.2A.a). Maximal effect was observed at 24 hours. LOX-1 protein levels normalized to the levels of  $\beta$ -actin (Fig.2A.b) are illustrated in Fig.2A.c. In contrast, treatment of HAECs for 24 hours with 0.2 mmol/l of palmitic acid, oleic acid or docosahexaenoic acid (DHA) did not affect LOX-1 protein expression (data not shown). LA-induced LOX-1 protein expression was dose-dependent (Fig. 2B.a). Induction of LOX-1 protein was already observed at 0.05 mmol/l LA and reached a maximum at 0.2 mmol/l. LOX-1 protein levels normalized to the levels of  $\beta$ -actin (Fig.2B.b) are illustrated in Fig. 2B.c.

### **Role of oxidative stress in LA-induced LOX-1 protein expression**

To evaluate whether oxidative stress is involved in the upregulation of LOX-1 by LA, HAECs were preincubated for 1 hour with vitamin C (10  $\mu\text{mol/l}$ ) or NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) prior to exposure to LA. Pretreatment of HAECs with these antioxidants totally prevented LA-induced LOX-1 protein expression (Fig.3A). LOX-1 protein levels normalized to the levels of  $\beta$ -actin (Fig.3B) are illustrated in Fig. 3C. (LOX-1 protein levels [% increase over control values]: LA:  $199\pm 13$ ; LA+vitamin C:  $98\pm 22$ ,  $P < 0.01$  vs LA; LA+NAC:  $77\pm 9$ ,  $P < 0.001$  vs LA).

### **Role of NADPH oxidase in LA-induced LOX-1 protein expression**

To ascertain the enzymatic superoxide sources activated by LA, HAECs were preincubated for 1 hour with the NADPH oxidase inhibitors, apocynin (10 $\mu\text{M}$ ) and DPI (10 $\mu\text{M}$ ) or with the mitochondrial electron transport chain inhibitors, TTFA (10 $\mu\text{M}$ ) and MnTBAP (100 $\mu\text{M}$ ) prior treatment with 0.2 $\text{mmol/l}$  LA. Pretreatment of HAECs with NADPH oxidase inhibitors prevented LA-induced LOX-1 protein expression, whereas mitochondrial electron transport chain inhibitors were ineffective (Fig. 4).

### **Role of protein kinase C (PKC) and NF- $\kappa$ B in LA-induced LOX-1 protein expression**

To examine the signaling pathways mediating the effect of LA on LOX-1, HAECs were treated for 1 hour with the pan specific PKC inhibitor, calphostin C (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), the NF- $\kappa$ B inhibitor, BAY11-7085 (40  $\mu\text{mol/l}$ ) or the AP-1 inhibitor, curcumin (15  $\mu\text{mol/l}$ ). As shown in Figure 5, pretreatment of the cells with calphostin C and



BAY11-7085, but not with curcumin, totally abolished the stimulatory effect of LA on LOX-1 protein expression.

### **Effect of LA on PKC expression**

To determine the expression of classic PKC isozymes in LA-treated cells, HAECs were treated for 15 hours with 0.2 mmol/l LA and expression of these isoforms were determined by western blot analysis. As illustrated in Fig. 6, LA increased the expression of PKC- $\alpha$  (1.9-fold), - $\beta_1$  (2.3-fold), - $\beta_{11}$  (3.5-fold) and - $\gamma$  (3.7-fold). Under these experimental conditions, no modulation of  $\beta$ -actin, used as an internal control, was observed.

### **Effect of LA on the binding of nuclear proteins to the regulatory NF- $\kappa$ B sequence of the LOX-1 gene promoter**

To determine whether the incubation of HAECs with LA might result in changes at the level of LOX-1 gene binding proteins, we measured the binding activity of nuclear proteins extracted from LA-treated HAECs to the NF- $\kappa$ B consensus sequence of the LOX-1 gene promoter. EMSA experiments showed that incubation of these cells for 6 hours with LA, resulted in a significant increase in the binding of nuclear proteins to the regulatory NF- $\kappa$ B sequence of the LOX-1 gene promoter (Fig. 7). This binding complex was specifically competed in the presence of a 1,000-fold molar excess of the unlabeled NF- $\kappa$ B oligonucleotide. This effect was also reduced by pretreatment of HAECs with the p65 antibody while pre-incubation of the cells with the p50 antibody, calphostin C, GF109203X, a classical PKC selective inhibitor, BAY11-7085, NAC or with vitamin C, totally abolished the

stimulatory effect of LA on the binding of nuclear proteins to NF- $\kappa$ B sequence of the LOX-1 gene promoter (Fig. 7).

**LA stimulates the uptake of oxLDL by endothelial cells through LOX-1**

To investigate whether LA might facilitate the uptake of oxLDL by endothelial cells and whether this effect involves LOX-1, HAECs were treated with 0.2 mmol/l LA for 23 hours, then incubation was pursued for 1 hour in the presence of saturating amounts of antibodies to LOX-1 or IgG<sub>1</sub> or in the presence of 500-fold excess of unlabeled oxLDL. At the end of the incubation period, cells were incubated for 3 hours with DiI-labeled oxLDL (80  $\mu$ g/ml) and uptake of oxLDL was determined by measurement of extracted DiI-oxLDL and fluorescence microscopy. Incubation of HAECs with LA increased by more than 2-fold, the uptake of oxLDL by these cells. This effect was totally blocked by pretreatment of the cells with anti-LOX-1 antibody or in the presence of excess unlabelled oxLDL. In contrast, no effect of the anti-IgG<sub>1</sub> antibody on LA-induced oxLDL uptake by endothelial cells was observed (Fig. 8).

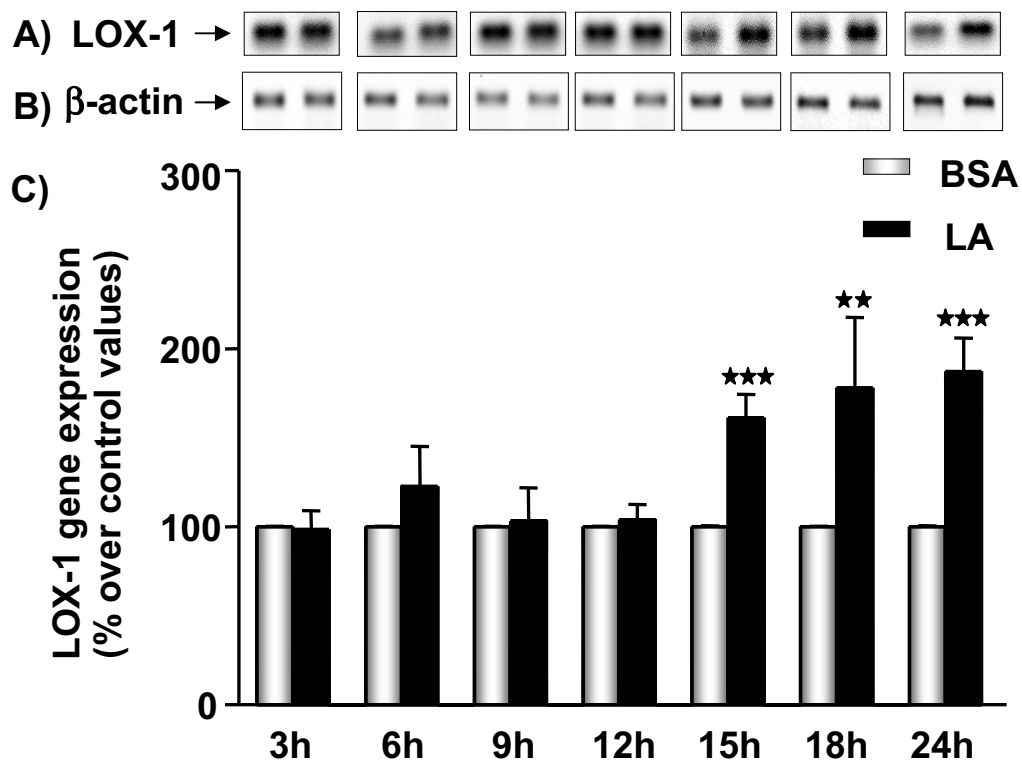


Fig. 1. Effect of LA on endothelial LOX-1 mRNA expression. HAECs were incubated for 3-24 h in the presence of 0.2 mmol/l LA. At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analysed by PCR for LOX-1 (A) and  $\beta$ -actin (B) mRNA expression. Levels of LOX-1 mRNA were normalized to the levels of  $\beta$ -actin mRNA (C). Results are mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \*\* $P$ <0.01 vs. BSA, \*\*\* $P$ <0.001 vs. BSA.

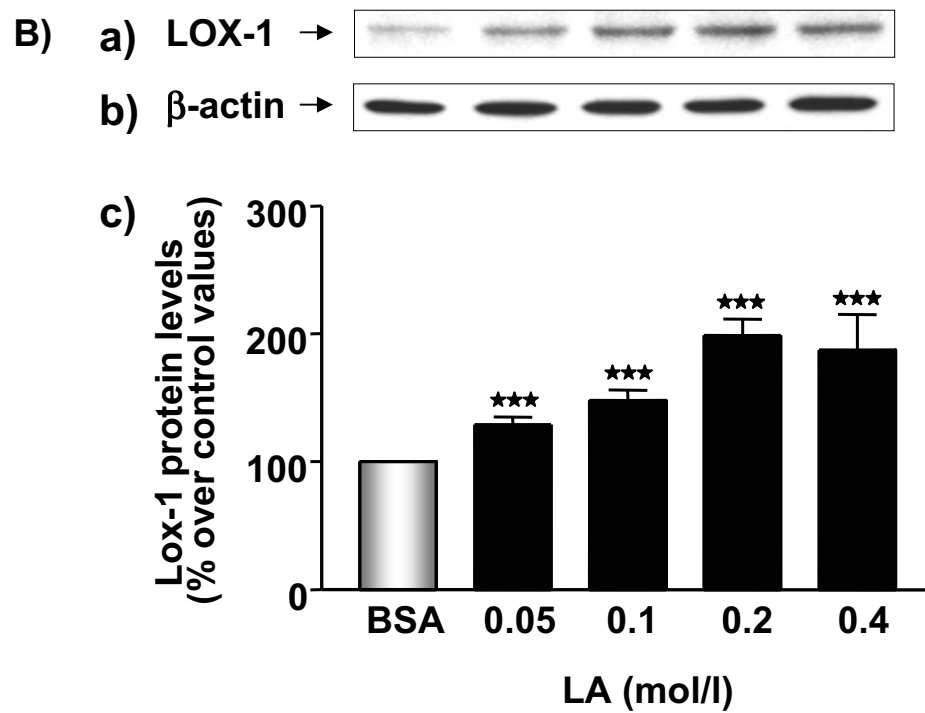
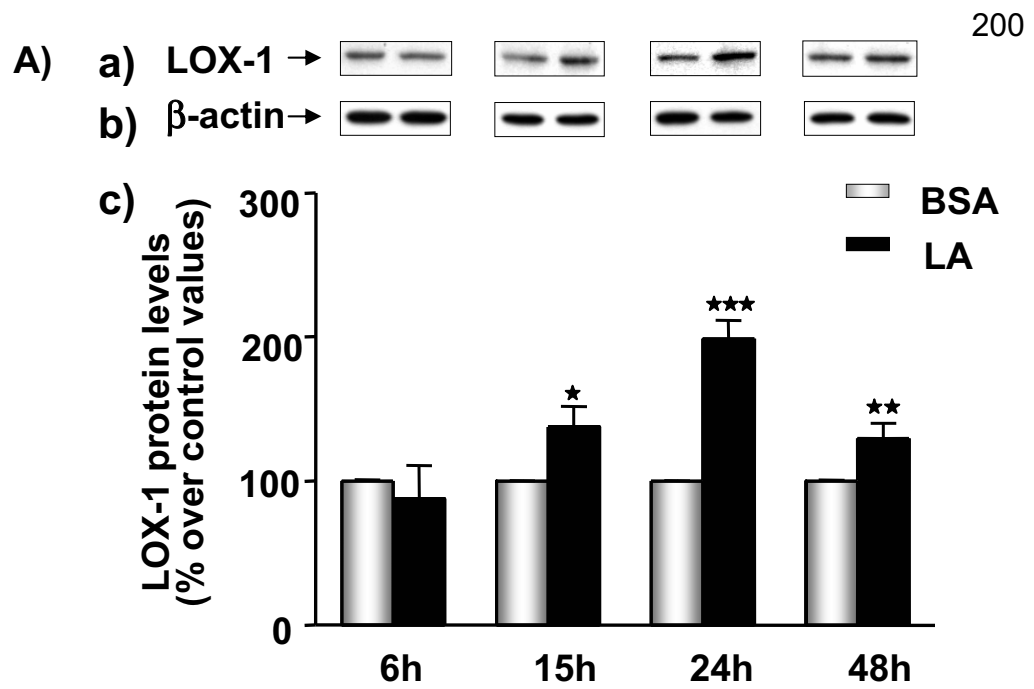


Fig. 2. Time- and dose-dependent effect of LA on endothelial LOX-1 protein expression. HAECs were cultured for 6-48 h with 0.2 mmol/l LA (Fig.2A) or for 24 h with 0.05-0.4 mmol/l LA (Fig.2.B). At the end of the incubation period, cells were lysed and LOX-1 protein expression was determined by Western blot analysis. LOX-1 protein levels were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein. Data are mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P$ <0.05 vs BSA, \*\* $P$ <0.01 vs BSA, \*\*\* $P$ <0.001 vs. BSA.

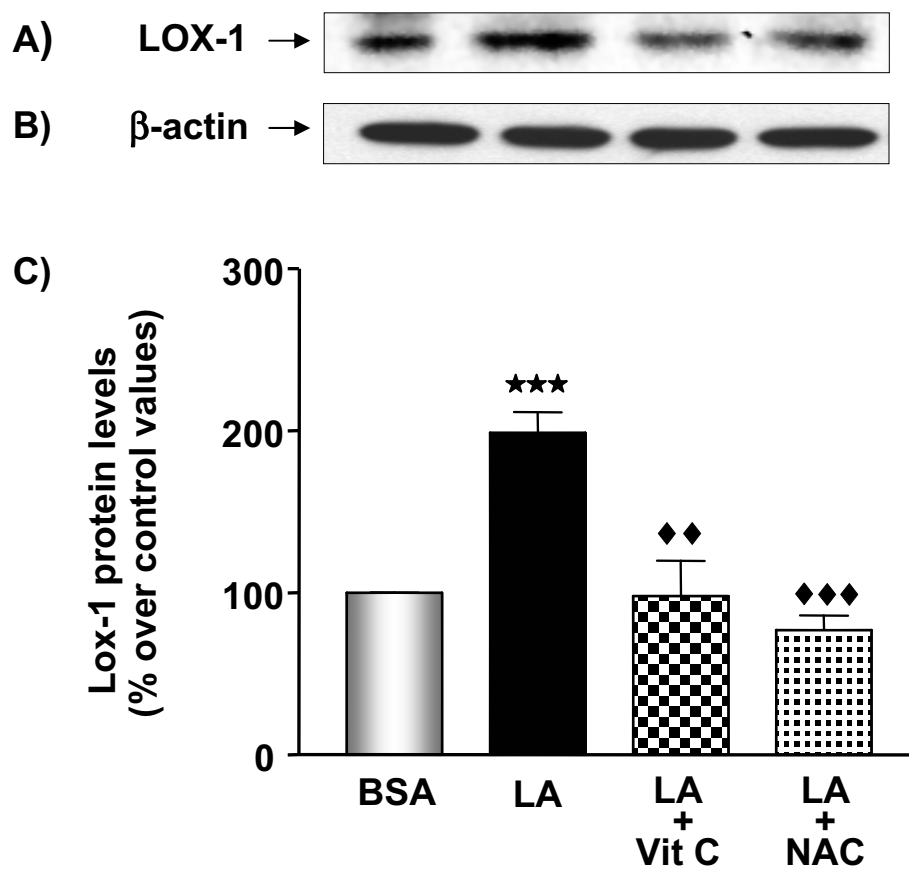


Fig. 3. Effect of antioxidants on LA-induced LOX-1 protein expression. HAECs were preincubated for 1 h in the presence of vitamin C (10  $\mu$ mol/l) or NAC (10 mmol/l), then treated for 24 h with 0.2 mmol/l LA. At the end of the incubation period, cells were lysed and LOX-1 protein expression was determined by Western blot analysis. LOX-1 protein levels (A) normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein (B) are presented on the graph bar (C). Data are mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \*\*\* $P$ <0.001 vs. BSA, ♦♦ $P$ <0.01 vs LA, ♦♦♦ $P$ <0.001 vs LA.

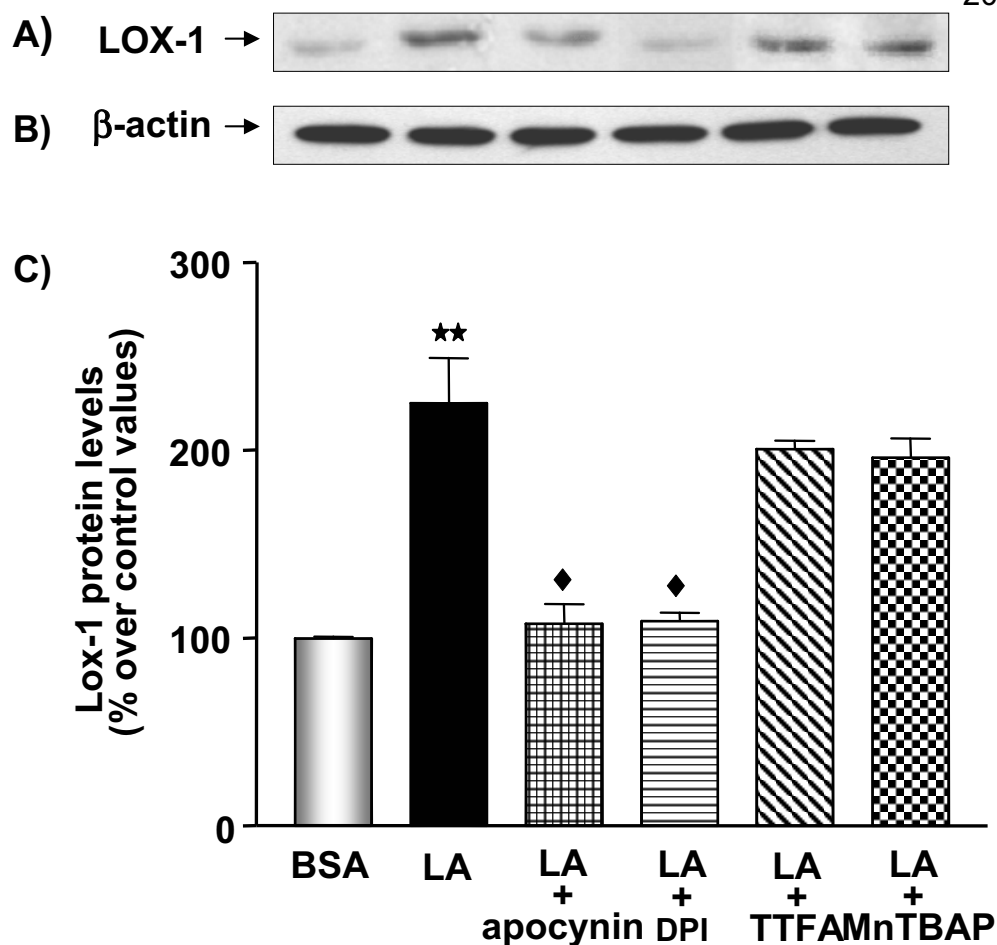


Figure 4. Effect of NADPH oxidase and mitochondrial electron transport chain inhibitors on LA-induced LOX-1 protein expression. HAECs were preincubated for 1 h with the NADPH oxidase inhibitors, apocynin (10 $\mu$ M) and DPI (10 $\mu$ M) or with the mitochondrial electron transport chain inhibitors, TTFAM (10 $\mu$ M) and MnTBAP (100 $\mu$ M) before treatment with 0.2mmol/l LA. At the end of the incubation period, cells were lysed and LOX-1 protein expression was determined by Western blot analysis. LOX-1 protein levels (A) normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein (B) are presented on the bar graph (C). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments, \*\* $P$ <0.01 vs. BSA,  $\blacklozenge$  $P$ <0.05 vs LA.

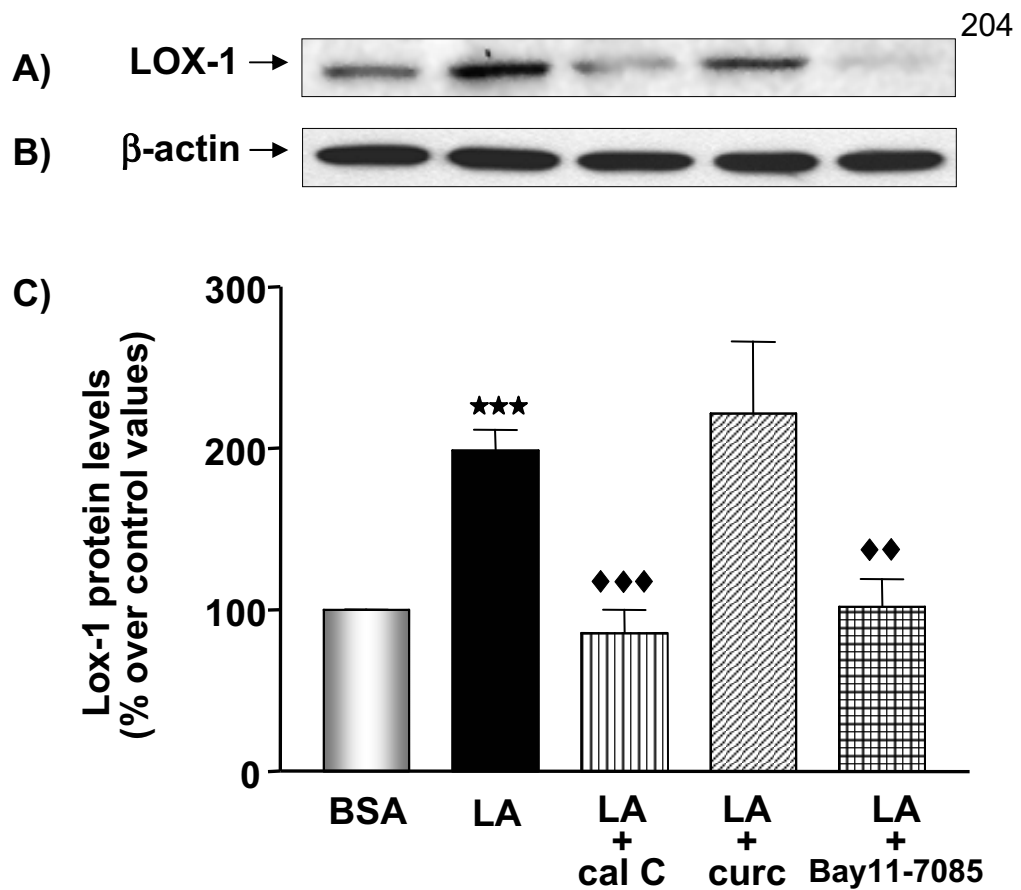


Fig. 5. Effect of PKC, NF- $\kappa$ B and activator protein 1 (AP-1) inhibitors on LA-induced LOX-1 protein expression. HAECs were pretreated for 1 h with the pan specific PKC inhibitor, calphostin C (cal C) (0.1  $\mu$ g/ml), the NF- $\kappa$ B inhibitor, BAY11-7085 (40  $\mu$ mol/l) or the AP-1 inhibitor, curcumin (curc) (15  $\mu$ mol/l), then exposed to 0.2 mmol/l LA for 24 h. At the end of the incubation period, cells were lysed and LOX-1 protein expression was determined by Western blot analysis. LOX-1 protein levels (A) were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein (B). Data illustrated on the graph (C) are mean  $\pm$  SEM of four different experiments, \*\*\* $P < 0.001$  VS. BSA, ◆◆ $P < 0.01$  VS LA, ◆◆◆ $P < 0.001$  VS LA.



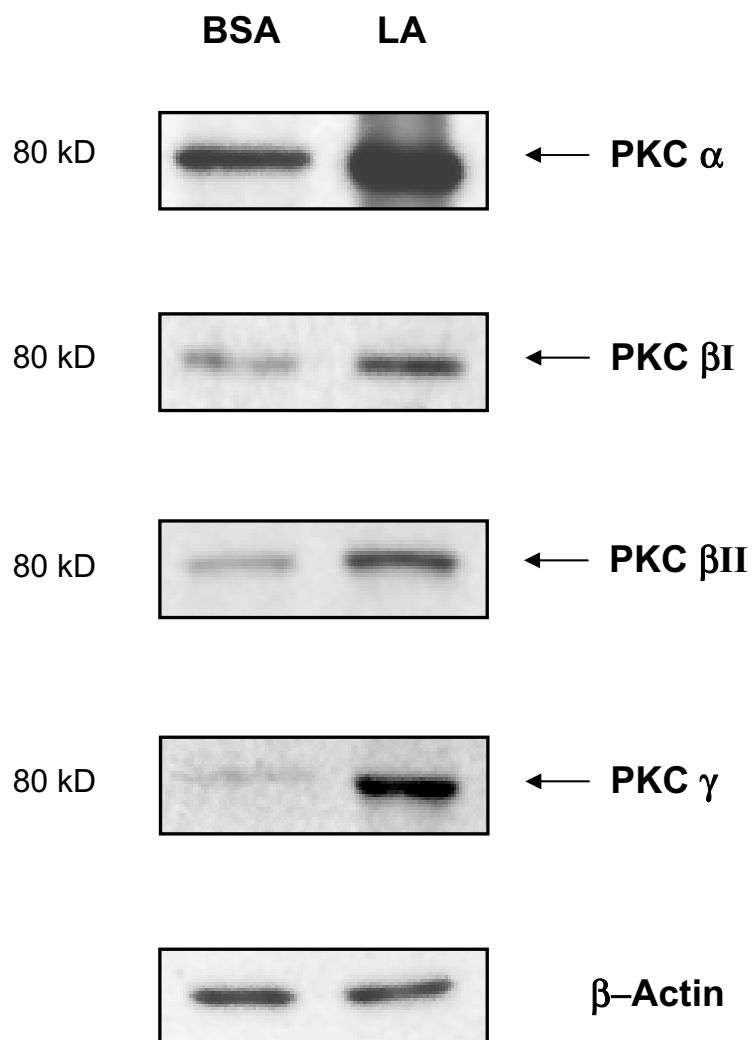


Fig. 6. Effect of LA on PKC expression. HAECs were incubated with 0.2 mmol/l LA for 15 h. Cell lysates were separated into cytosolic and membrane fractions and assayed for classic PKC isoforms by Western blot analysis as described in *Research Design and Methods*. Data showing membrane PKC expression are presented. The figure illustrates the results of one representative experiment out of three.

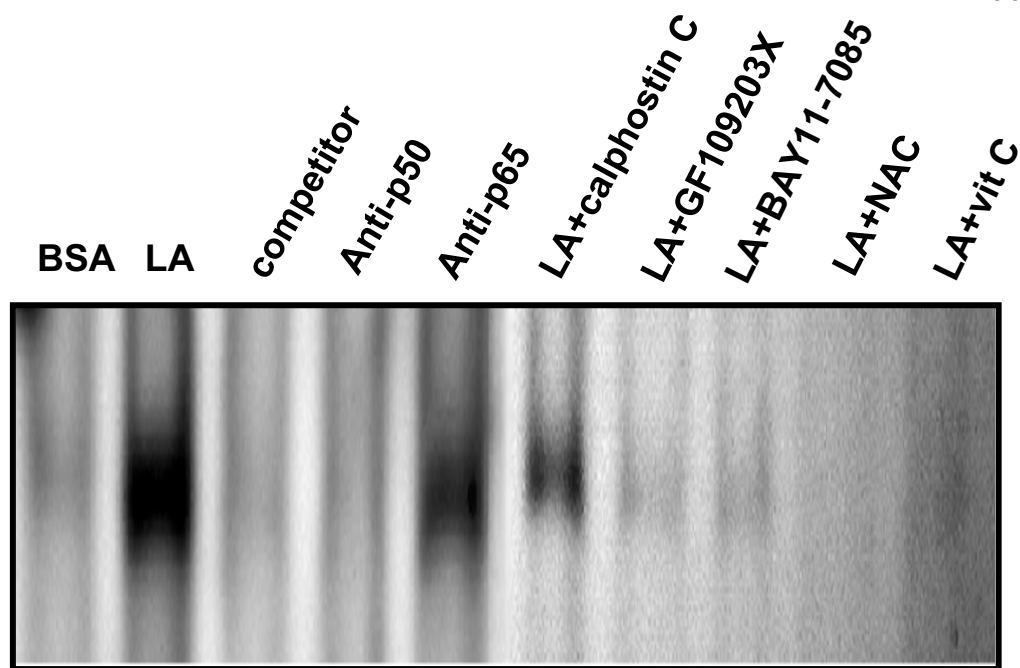
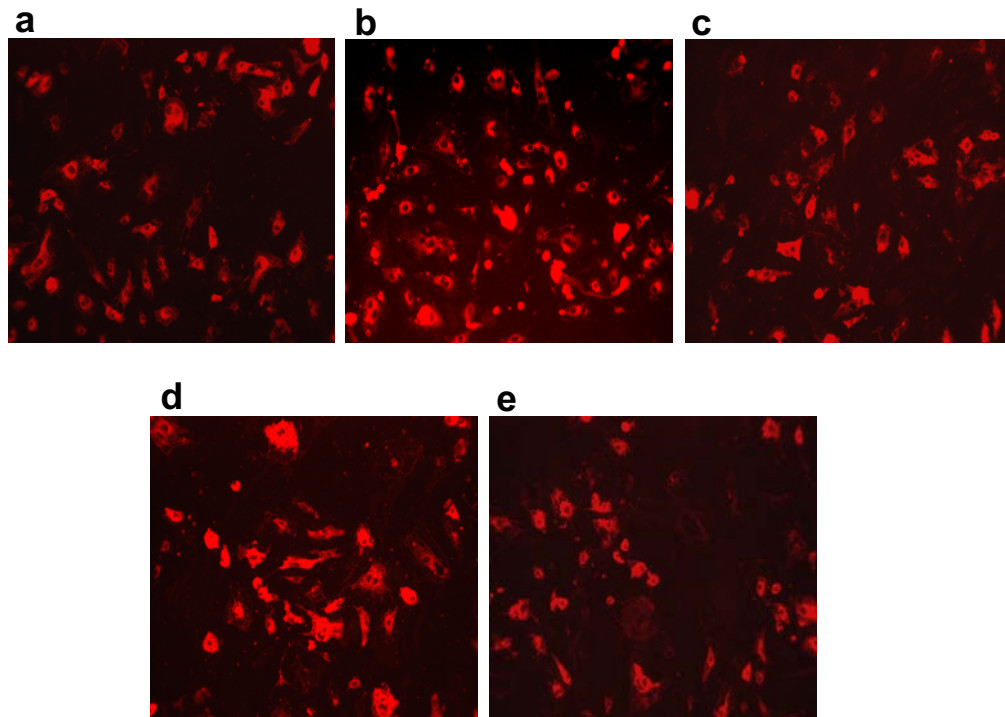


Fig. 7. Effect of LA on the binding of nuclear proteins to the regulatory NF- $\kappa$ B sequence of the LOX-1 gene promoter. HAECs were pretreated for 1 h with the pan-specific PKC inhibitor, calphostin C (0.1  $\mu$ g/ml), the classic PKC selective inhibitor, GF109203X (20 nmol/l), the NF- $\kappa$ B inhibitor, BAY11-7085 (40  $\mu$ mol/l), or the antioxidants, vitamin C (Vit C) (10  $\mu$ mol/l) or NAC (10 mmol/l), then stimulated for the next 6 h with 0.2 mmol/l LA. Nuclear proteins isolated from these cells were incubated with end-labeled NF- $\kappa$ B specific consensus sequence of the LOX-1 gene promoter in the presence or absence of a 1,000-fold molar excess of the unlabeled DNA probe (competitor). Retardation was assessed by gel electrophoresis in 4% PAGE. In some experiments, nuclear proteins were incubated in the presence of anti-p50 or anti-p65 antibodies. Data are the results of one representative experiment out of three.

A)



B)

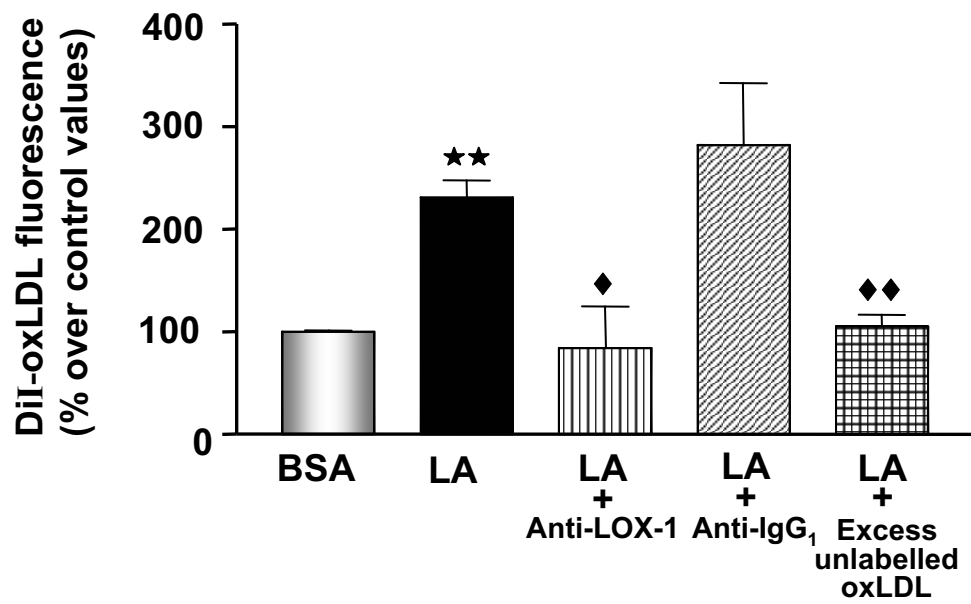


Fig. 8. Effect of LA on oxLDL uptake by endothelial cells. HAECs were incubated for 23 h with LA (0.2 mmol/l), and then incubation was pursued for 1 h in the presence or absence of saturating amounts (20  $\mu$ g/ml) of LOX-1 or IgG1 antibodies. At the end of the incubation period, cell were exposed for 3 h to Dil-oxLDL (80  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of a 500-fold excess of unlabeled oxLDL. After washing, fluorescence of Dil was detected in the cytoplasm of HAECs by fluorescence microscopy (A): a) BSA-treated cells; b) LA-treated cells; c) LA-treated cells + LOX-1 antibody; d) LA-treated cells + IgG1 antibody; e) LA-treated cells + excess unlabeled oxLDL. (B) Fluorescence measured at 520/564nm. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments, \*\*P<0.01 vs. BSA, •P<0.05 vs LA, ••P<0.01 vs LA

## DISCUSSION

The hypothesis that release of fatty acids during lipoprotein lipase (LPL)-mediated triglyceride hydrolysis may be atherogenic by causing endothelial injury was first proposed in the 70s by Zilversmit (15). Today, it is generally accepted that selected fatty acids, and especially n-6 unsaturated fatty acids derived from the hydrolysis of lipoproteins, may cause ED. Of all the fatty acids, LA appears to be the one with the most profound and deleterious effects on endothelial barrier function (4;16). This could be related to the very low basal activity of elongase and desaturase enzymes in endothelial cells, thus preventing arachidonic acid formation from LA in these cells (17). Mechanisms of LA-mediated ED are numerous. They include disruption of endothelial cell integrity with alterations of functions of gap-junctions proteins (18), cell morphology (19), membrane-bound enzymes (20), peroxisome (21) and induction of apoptotic cell death (22). Last but not least, accumulating evidence suggests that increase in intracellular oxidative stress and calcium levels (10;23) could be the main mechanisms by which LA exerts its harmful effects on endothelial cells.

The significance of fatty acids, and especially LA, in the development of ED associated with human diabetes is supported by several observations. First, elevated levels of fatty acid-containing lipoproteins and circulating levels of free fatty acids are reported in diabetes (24;25). Second, upregulation of stearoyl-CoA desaturase by glucose may enhance the conversion of saturated to unsaturated fatty acids in the diabetic state (26). Third, LPL, the rate limiting enzyme for triglyceride hydrolysis (15) is increased in patients with type 2 diabetes (27) and

upregulated by fatty acids, including LA (28). Such high LPL activity in diabetes is likely to favour endothelial cell exposure to high levels of free fatty acids. Finally, increased concentrations of LA have been documented in all LDL subfractions in patients with type 2 diabetes (13).

A role for LOX-1 as major pathogenic determinant of ED associated with type 2 diabetes has recently been proposed. Consistent with this concept, it has been shown that endothelial LOX-1 is increased in diabetic animals and upregulated by metabolic and inflammatory factors dysregulated in diabetes, including glucose (7), AGEs (8) and CRP (9). The present study which demonstrates that LA, at concentrations similar to those found in diabetic patients (29), upregulates endothelial LOX-1 further supports a role for this receptor in diabetes-related ED. Induction of LOX-1 by LA appears to be exerted at the transcriptional level as reflected by the parallel increase in LOX-1 gene and protein expression.

Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B is critical for the expression of inflammatory genes involved in ED and evidence exists that LA activates this transcription factor and induces NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in endothelial cells (23;30). Consistent with these data, we found that LA enhances the binding of nuclear proteins to the NF- $\kappa$ B consensus sequence of the LOX-1 gene promoter (14) and that inhibition of NF- $\kappa$ B totally prevented LA-induced LOX-1 expression. On the whole, these data strongly suggest that activation of the LOX-1 gene by LA involves NF- $\kappa$ B.

Oxidative stress is a critical signal transduction pathway involved in NF- $\kappa$ B activation and several evidences suggest that LA-mediated ED involves increased cellular oxidative stress. This assumption is mainly based on results from in vitro studies showing, in LA-treated endothelial cells, an increased production of reactive oxygen species and lipid hydroperoxides (23) with significant depletion in intracellular glutathione levels (11). Additional support for this hypothesis comes from the observations that LA induces, through oxidative stress, several endothelial cell inflammatory genes in vitro (10;31;32) and increases oxidative stress in vivo (33). Like many other endothelial antigens involved in endothelial cell activation/dysfunction, regulation of LOX-1 expression is redox-sensitive (34) and molecules that induce oxidative stress, such as homocysteine and angiotensin II, enhance LOX-1 expression (34;35). Our results showing that vitamin C and NAC inhibit the stimulatory effect of LA on LOX-1 protein expression clearly identify endothelial LOX-1 as a novel oxidative stress-sensitive target for LA. In agreement with previous studies (36;37), we found that NADPH oxidase inhibitors prevented LA-induced protein expression, thus indicating that NADPH oxidase is one of the enzymatic superoxide sources activated by LA. Considering the potential key role of LOX-1 in ED, these results further support the concept that oxidative stress may constitute an important mechanism responsible for LA-mediated ED.

Superoxide per se is a strong stimulus for the activation of PKC (38). PKC activation has been implicated in ED associated with type 2 diabetes (1) and LA has been shown to activate PKC activity in various cell types (39-41). Considering

the causal link between oxidative stress and PKC activation and the well documented role of this kinase in NF- $\kappa$ B activation, we elaborated a tentative model in which sequential activation of the redox-sensitive PKC and NF- $\kappa$ B signaling pathways could mediate the regulatory effect of LA on endothelial LOX-1 gene expression. Our data which demonstrate that calphostin C totally abolished the stimulatory effect of LA on NF- $\kappa$ B activation and LOX-1 protein expression support this hypothesis. Furthermore, our finding that incubation of the cells with GF109203X, a selective inhibitor of the conventional PKCs, exerts identical effects and that LA activates PKC- $\alpha$ , - $\beta$ <sub>I</sub>, - $\beta$ <sub>II</sub> and - $\gamma$  further suggests a role for these isotype-specific PKC isoforms in the induction of endothelial LOX-1 by LA. These results are in agreement with previous studies showing that FA activate preferentially "soluble"  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  isoenzymes of PKC (42;43) and that LA activates PKC- $\alpha$  and - $\beta$  in mouse mammary epithelial cells (44) and PKC- $\alpha$  in rat pancreatic acinar cells (41).

Endothelial cells do express different types of scavenger receptors (SR), including CD36, SR-A, SR-B and LOX-1. Although the role of fatty acids on vascular cell SR expression has been poorly investigated, studies have shown that polyunsaturated fatty acids and myristic acid increase the expression of hepatic SR-B1 expression (45;46), and that LA enhances CD36 expression in human monocytic cells (47). To the best of our knowledge, the present study demonstrates for the first time a role for fatty acids in vascular LOX-1 regulation. In agreement with the notion that LOX-1 mediates the uptake of oxLDL by endothelial



cells (5), we found that upregulation of LOX-1 by LA is associated with significant increased uptake of oxLDL by HAECs. Taken collectively, these data suggest a new mechanism by which LA may promote ED, that of triggering the toxic effects of oxLDL on vascular endothelium through LOX-1.

Multiple findings have linked LA to atherosclerosis. First it has been shown that adipose tissue levels of LA correlate with the degree of coronary artery disease (48) and with the appearance of new atherosclerotic lesions in coronary arteries (49). Second evidence has been provided that concentrations of LA are increased in the phospholipidic fractions of human coronary arteries in case of sudden cardiac death due to ischemic heart disease (50). Finally, a study in the Israeli population, which has one of the highest dietary polyunsaturated/saturated fat ratio in the world, concluded that diets rich in omega-6 fatty acids may contribute to an increased incidence of atherosclerosis (51). Considering the potential key relationship between LA and atherogenesis, induction of endothelial LOX-1 expression by LA may represent a new mechanism by which this fatty acid may favor the development of atherosclerosis. Strategies aimed at reducing vascular LOX-1 expression could be beneficial in reducing atherosclerotic lesion development associated with human diabetes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported in part by a grant from the Association Diabète Québec. Fritz Maingrette is supported by studentships from the CHUM Research Center and from the department of Nutrition, University of Montreal.

**REFERENCES**

1. Calles-Escandon,J, Cipolla,M: Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr.Rev.* 22:36-52, 2001
2. Johnstone,MT, Creager,SJ, Scales,KM, Cusco,JA, Lee,BK, Creager,MA: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510-2516, 1993
3. Kita,T, Kume,N, Minami,M, Hayashida,K, Murayama,T, Sano,H, Moriwaki,H, Kataoka,H, Nishi,E, Horiuchi,H, Arai,H, Yokode,M: Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947:199-205, 2001
4. Hennig,B, Toborek,M, McClain,CJ: High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J.Am.Coll.Nutr.* 20:97-105, 2001
5. Sawamura,T, Kume,N, Aoyama,T, Moriwaki,H, Hoshikawa,H, Aiba,Y, Tanaka,T, Miwa,S, Katsura,Y, Kita,T, Masaki,T: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386:73-77, 1997
6. Aoyama,T, Fujiwara,H, Masaki,T, Sawamura,T: Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31:2101-2114, 1999

7. Li,L, Sawamura,T, Renier,G: Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium. *Diabetes* 52:1843-1850, 2003
8. Chen,M, Nagase,M, Fujita,T, Narumiya,S, Masaki,T, Sawamura,T: Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 287:962-968, 2001
9. Li,L, Roumeliotis,N, Sawamura,T, Renier,G: C-Reactive Protein Enhances LOX-1 Expression in Human Aortic Endothelial Cells. Relevance of LOX-1 to C-Reactive Protein-Induced Endothelial Dysfunction. *Circ.Res.* 2004
10. Young,VM, Toborek,M, Yang,F, McClain,CJ, Hennig,B: Effect of linoleic acid on endothelial cell inflammatory mediators. *Metabolism* 47:566-572, 1998
11. Hennig,B, Meerarani,P, Ramadass,P, Watkins,BA, Toborek,M: Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism* 49:1006-1013, 2000
12. Toborek,M, Lee,YW, Garrido,R, Kaiser,S, Hennig,B: Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am.J.Clin.Nutr.* 75:119-125, 2002

13. Prescott,J, Owens,D, Collins,P, Johnson,A, Tomkin,GH: The fatty acid distribution in low density lipoprotein in diabetes. *Biochim.Biophys.Acta* 1439:110-116, 1999
14. Nagase,M, Abe,J, Takahashi,K, Ando,J, Hirose,S, Fujita,T: Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) gene. *J.Biol.Chem.* 273:33702-33707, 1998
15. Zilversmit,DB: A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins. *Circ.Res.* 33:633-638, 1973
16. Toborek,M, Hennig,B: The role of linoleic acid in endothelial cell gene expression. Relationship to atherosclerosis. *Subcell.Biochem.* 30:415-436, 1998
17. Hennig,B, Watkins,BA: Linoleic acid and linolenic acid: effect on permeability properties of cultured endothelial cell monolayers. *Am.J.Clin.Nutr.* 49:301-305, 1989

18. Jiang,WG, Bryce,RP, Horrobin,DF, Mansel,RE: Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 244:414-420, 1998
19. Denning,GM, Figard,PH, Kaduce,TL, Spector,AA: Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. *J.Lipid Res.* 24:993-1001, 1983
20. Ramasamy,S, Boissonneault,GA, Decker,EA, Hennig,B: Linoleic acid-induced endothelial cell injury: role of membrane-bound enzyme activities and lipid oxidation. *J.Biochem.Toxicol.* 6:29-35, 1991
21. Hennig,B, Boissonneault,GA, Chow,CK, Wang,Y, Matulionis,DH, Glauert,HP: Effect of vitamin E on linoleic acid-mediated induction of peroxisomal enzymes in cultured porcine endothelial cells. *J.Nutr.* 120:331-337, 1990
22. Toborek,M, Blanc,EM, Kaiser,S, Mattson,MP, Hennig,B: Linoleic acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis, and apoptosis of cultured vascular endothelial cells. *J.Lipid Res.* 38:2155-2167, 1997
23. Hennig,B, Toborek,M, Joshi-Barve,S, Barger,SW, Barve,S, Mattson,MP, McClain,CJ: Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-

- kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am.J.Clin.Nutr.* 63:322-328, 1996
24. Erkelens,DW: Diabetic dyslipidaemia. *Eur.Heart J.* 19 Suppl H:H27-H40, 1998
  25. Kelley,DE, Simoneau,JA: Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest* 94:2349-2356, 1994
  26. Jones,BH, Standridge,MK, Claycombe,KJ, Smith,PJ, Moustaid-Moussa,N: Glucose induces expression of stearoyl-CoA desaturase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.J.* 335 ( Pt 2):405-408, 1998
  27. Sartippour,MR, Renier,G: Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: role of peripheral factors. *Diabetes* 49:597-602, 2000
  28. Michaud,SE, Renier,G: Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes* 50:660-666, 2001
  29. Kwok,CF, Shih,KC, Hwu,CM, Ho,LT: Linoleic acid and oleic acid increase the endothelin-1 binding and action in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Metabolism* 49:1386-1389, 2000

30. Toborek,M, Barger,SW, Mattson,MP, Barve,S, McClain,CJ, Hennig,B: Linoleic acid and TNF-alpha cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J.Lipid Res.* 37:123-135, 1996
31. Dichtl,W, Ares,MP, Jonson,AN, Jovinge,S, Pachinger,O, Giachelli,CM, Hamsten,A, Eriksson,P, Nilsson,J: Linoleic acid-stimulated vascular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells depends on nuclear factor-kappaB activation. *Metabolism* 51:327-333, 2002
32. Woo,LY, Joo,PH, Hennig,B, Toborek,M: Linoleic acid induces MCP-1 gene expression in human microvascular endothelial cells through an oxidative mechanism. *J.Nutr.Biochem.* 12:648-654, 2001
33. Turpeinen,AM, Basu,S, Mutanen,M: A high linoleic acid diet increases oxidative stress in vivo and affects nitric oxide metabolism in humans. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 59:229-233, 1998
34. Nagase,M, Ando,K, Nagase,T, Kaname,S, Sawamura,T, Fujita,T: Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 281:720-725, 2001
35. Li,DY, Zhang,YC, Philips,MI, Sawamura,T, Mehta,JL: Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured

- human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ.Res.* 84:1043-1049, 1999
36. Cui,XL, Douglas,JG: Arachidonic acid activates c-jun N-terminal kinase through NADPH oxidase in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:3771-3776, 1997
37. Cury-Boaventura,MF, Curi,R: Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by 18 carbon fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clin.Sci.(Lond)* 2004
38. Nishikawa,T, Edelstein,D, Du,XL, Yamagishi,S, Matsumura,T, Kaneda,Y, Yorek,MA, Beebe,D, Oates,PJ, Hammes,HP, Giardino,I, Brownlee,M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790, 2000
39. Graber,R, Sumida,C, Nunez,EA: Fatty acids and cell signal transduction. *J.Lipid Mediat.Cell Signal.* 9:91-116, 1994
40. Lester,DS: In vitro linoleic acid activation of protein kinase C. *Biochim.Biophys.Acta* 1054:297-303, 1990



41. Wooten,MW, Wrenn,RW: Linoleic acid is a potent activator of protein kinase C type III-alpha isoform in pancreatic acinar cells; its role in amylase secretion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 153:67-73, 1988
42. el Touny,S, Khan,W, Hannun,Y: Regulation of platelet protein kinase C by oleic acid. Kinetic analysis of allosteric regulation and effects on autophosphorylation, phorbol ester binding, and susceptibility to inhibition. *J.Biol.Chem.* 265:16437-16443, 1990
43. Khan,WA, Blobe,GC, Hannun,YA: Activation of protein kinase C by oleic acid. Determination and analysis of inhibition by detergent micelles and physiologic membranes: requirement for free oleate. *J.Biol.Chem.* 267:3605-3612, 1992
44. Bandyopadhyay,GK, Hwang,S, Imagawa,W, Nandi,S: Role of polyunsaturated fatty acids as signal transducers: amplification of signals from growth factor receptors by fatty acids in mammary epithelial cells. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 48:71-78, 1993
45. Loison,C, Mendy,F, Serougne,C, Lutton,C: Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration and liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *Br.J.Nutr.* 87:199-210, 2002

46. Spady,DK, Kearney,DM, Hobbs,HH: Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J.Lipid Res.* 40:1384-1394, 1999
47. Pietsch,A, Weber,C, Goretzki,M, Weber,PC, Lorenz,RL: N-3 but not N-6 fatty acids reduce the expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Cell Biochem.Funct.* 13:211-216, 1995
48. Hodgson,JM, Wahlqvist,ML, Boxall,JA, Balazs,ND: Can linoleic acid contribute to coronary artery disease? *Am.J.Clin.Nutr.* 58:228-234, 1993
49. Blankenhorn,DH, Johnson,RL, Mack,WJ, el Zein,HA, Vailas,LI: The influence of diet on the appearance of new lesions in human coronary arteries. *JAMA* 263:1646-1652, 1990
50. Luostarinen,R, Boberg,M, Saldeen,T: Fatty acid composition in total phospholipids of human coronary arteries in sudden cardiac death. *Atherosclerosis* 99:187-193, 1993
51. Yam,D, Eliraz,A, Berry,EM: Diet and disease--the Israeli paradox: possible dangers of a high omega-6 polyunsaturated fatty acid diet. *Isr.J.Med.Sci.* 32:1134-1143, 1996

## **II.3 Troisième article**

*J Lipid Res* 49: 1926-1935, 2008

**C-REACTIVE PROTEIN ENHANCES MACROPHAGE LIPOPROTEIN LIPASE  
EXPRESSION.**

Fritz Maingrette<sup>1</sup>, Ling Li<sup>2</sup>, and Geneviève Renier<sup>1,2</sup>.

From the <sup>1</sup>Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada and the <sup>2</sup>Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Centre, Notre-Dame Hospital, Department of Medicine, Montreal, Quebec, Canada.

Running title: CRP enhances macrophage LPL expression

Address correspondence and reprint requests to:

Geneviève Renier, MD, PhD

CHUM Research Centre, Notre-Dame Hospital

Mailloux Pavilion, K5207

1560 Sherbrooke Street East

Montreal, Quebec

Canada H2L 4M1

Tel: (514) 890-8000 ext. 26895

Fax: (514) 412-7661

Email: [genevieve.renier@umontreal.ca](mailto:genevieve.renier@umontreal.ca)

**ABSTRACT**

High serum levels of C-reactive protein (CRP), a strong predictor of cardiovascular events, are documented in patients with type 2 diabetes. Accumulating evidence suggests that CRP could directly promote arterial damage. To determine the role of CRP in diabetic atherosclerosis, we examined the effect of CRP on the expression of macrophage lipoprotein lipase (LPL), a proatherogenic molecule upregulated in type 2 diabetes. Treatment of human macrophages with native CRP increased in a dose- and time-dependent manner, LPL protein expression and secretion. Modified CRP reproduced these effects. Preincubation of human macrophages with antioxidants, PKC and MAPK inhibitors prevented CRP-induced LPL expression. Exposure of human macrophages to CRP further increased intracellular ROS generation, classic PKC isozymes expression and ERK1/2 phosphorylation. In CRP-treated J774 macrophages, increased macrophage LPL mRNA levels and enhanced binding of nuclear proteins to the AP-1- enhancing element were observed. These effects were prevented by antioxidants as well as by PKC, MAPK and AP-1 inhibitors. These data show for the first time that CRP directly increases macrophage LPL expression and secretion. Given the predominant role of macrophage LPL in atherogenesis, LPL might represent a novel factor underlying the adverse effect of CRP on the diabetic vasculature.

**Keywords:** C-reactive protein, macrophage, lipoprotein lipase, atherosclerosis, type 2 diabetes.

Since the hypothesis that inflammation might be an accomplice in the pathogenesis of atherosclerosis and type 2 diabetes was first proposed, many epidemiological and clinical studies have shown that circulating markers of inflammation predict the risk of future cardiovascular (CV) events and type 2 diabetes and that an ongoing acute phase response is present in patients with type 2 diabetes (1). In addition of being a CV risk marker (2, 3), C-reactive protein (CRP) could also make a direct contribution to the atherosclerotic process. Supporting this possibility, it has been shown that CRP is present in the plaque (4) and that exposure of cultured vascular cells to CRP leads to various pro-inflammatory and pro-atherogenic effects. Among the cell types found in the lesion, monocytes/macrophages have essential functions in all phases of atherosclerosis. Interaction of CRP with these cells induces an increase in the secretion of inflammatory mediators such as cytokines and chemokines (5, 6). Additional effects of CRP on monocytes/macrophages include induction of colony stimulating factor (CSF), matrix metalloproteinase (MMP), nitric oxide and tumoricidal activity (7-10). Most importantly, CRP also appears to promote monocyte infiltration into the vessel wall (11) and their subsequent development into foam cells (12).

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in the hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins that is abundantly expressed by macrophages in the atherosclerotic lesion. Expression of macrophage-derived LPL in the arterial wall is pro-atherogenic (13, 14), likely via the enhancement of foam cell formation (15). We previously demonstrated that macrophage LPL is upregulated in patients with accelerated atherosclerosis, including type 2 diabetes (16-18) and have identified

several macrophage LPL-stimulatory factors relevant to diabetes-related atherogenesis (19-23). Given the concomitant upregulation of CRP and macrophage LPL in human diabetes, we sought to investigate the regulation of macrophage LPL expression by CRP and the signalling pathways involved in this effect. Our data which demonstrate a direct stimulatory effect of CRP on LPL secretion by cultured macrophages suggest a new mechanism for the proatherogenic effect of CRP.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Reagents

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Wisent (St. Bruno, Quebec, Canada). RPMI 1640 medium, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Hank's balanced salt solution (HBSS), penicillin-streptomycin, glycine, sodium dodecyl sulfate (SDS) and Trizol reagent were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Calphostin C, *N*-acetylcysteine (NAC), GF109203X, U0126, PD98059, BAY11-7085, curcumin, a non specific AP-1 inhibitor and the pseudosubstrate myristoylated peptide inhibitor of PKC $\alpha$  and  $\beta$  (20-28) were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Affinity-purified polyclonal antibody against extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 and antibodies against protein kinase C (PKC)- $\alpha$ , - $\beta$ <sub>I</sub>, - $\beta$ <sub>II</sub> and - $\gamma$  were bought from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phospho-ERK1/2 antibody was obtained from Cell Signaling Technology (Pickering, ON, Canada). LY379196 was kindly provided by Eli Lilly (Indianapolis, IN). Monoclonal antibodies to human CD32 and CD64 were purchased from Lab Vision Corporation (Fremont, CA) and Ancell (Bayport, MN), respectively. Monoclonal antibody to human CD16 was kindly provided by Dr Marika Sarfati, CHUM Research Center, Montreal, Canada. Vitamin E, E-TOXATE kit, sodium azide (NaN<sub>3</sub>), D-glucose and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). END-X B15 endotoxin removal affinity resin kit was obtained from Seikagaku America (Falmouth, MA).



**CRP**

Highly purified (>99%) recombinant human native CRP (nCRP) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Purity of the nCRP preparation was confirmed by 12% SDS-PAGE. Endotoxin content of the recombinant CRP preparations was determined using the E-TOXATE kit. After removal of endotoxin using END-X B15 endotoxin removal affinity resin, nCRP was free of endotoxin, as assessed by the Limulus assay (<3 pg/ml). NaN<sub>3</sub> was removed from the commercial CRP preparation by dialysis against 500 ml 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 140 mmol/L NaCl, 2 mmol CaCl<sub>2</sub> at 4°C. Modified CRP (mCRP) was prepared from nCRP by urea chelation. Briefly, nCRP was incubated with 8.0 M urea for 2 hours at 37°C, then dialyzed against low ionic strength Tris-buffered saline.

**Human macrophages**

Human monocytes were isolated as previously described (23). Differentiation of monocytes into 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. At day 8, the medium of fully differentiated macrophages was changed to serum-free medium and cells were stimulated for different time periods with various concentrations of CRP.

**Murine macrophages**

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

**Western blot analysis**

LPL detection was achieved by immunoprecipitation followed by Western blot analysis as previously described (23). Briefly, after centrifugation of cell homogenates, the supernatant was collected and used for immunoprecipitation. Samples were incubated with the monoclonal anti-LPL 5D2 antibody (received from J.D. Brunzell, University of Washington, Seattle, WA) followed by incubation with anti-mouse IgG antiserum (Bio Rad, Hercules, CA). The immunocomplexes were collected on protein A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz, CA) and washed. The pellet was resuspended in 1 x SDS-loading buffer and samples were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were incubated with the 5D2 antibody and then detected with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (1/5,000) followed by enhanced chemiluminescence. Band intensity was quantified by densitometry. Measurement of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) phosphorylation and classic PKC isoforms expression was performed by Western blot analysis using specific antibodies.

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

Determination of LPL gene expression in J774 murine macrophages was performed by Northern blot analysis as described previously (23). After treatment, cells were lysed and total RNA was separated on a 1.2% agarose gel. mRNA expression was analyzed by hybridization with [<sup>32</sup>P]dCTP-labeled LPL and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA probes.

### **DNA probes**

The cDNA probe for detection of murine LPL was prepared by the PCR technique (23). The cDNA probes for murine GAPDH was purchased from ATCC. A 20-mer double-stranded oligonucleotide (5'-GGGCACCTGACTAAGGCCAG-3'; 5'-TGTGCTGGCCTTAGTCAGGT-3') containing the consensus sequence for the activated protein-1 (AP-1)-responsive element of the murine LPL gene promoter was synthesized. 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).

### **DNA binding assay**

Isolation of the nuclei was performed as described previously (23). After lysis of the nuclei, aliquots of the supernatants were frozen at -80°C, and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assay was performed as described previously (23).

**Measurements of intracellular reactive oxygen species (ROS) generation**

Human monocytes were plated at a density of  $5 \times 10^5$ / well in a 96 MicroWell Nunclon  $\Delta$  sterile optical bottom plate (Nunc, Rochester, NY) 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. At day 8, fully differentiated macrophages were treated with 3  $\mu$ g/ml CRP for 1h, then washed prior to the addition of the cell-permeable fluorogenic DCF-DA (10  $\mu$ mol/l) probe for 30 min. At the end of this incubation period, cells were washed with cold PBS, then fixed with 2% paraformaldehyde. Intracellular ROS generation was quickly monitored by measuring fluorescence, using excitation and emission wavelengths of 498 and 522nm, respectively.

**Determination of extracellular LPL activity.**

One hour before the end of the incubation period, 50 U/ml heparin was added to the medium. Extracellular LPL activity was determined using the Confluolip kit (Progen, Heidelberg, Germany). Levels of macrophage LPL activity were normalized to levels of total cell proteins.

**Determination of cell viability**

Cell viability after treatment with CRP and pharmacological inhibitors was assessed by trypan blue exclusion and was consistently found to be > 90%.

**Determination of total protein concentration**

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

**Statistical analysis**

Data presented were generated using blood obtained from different donors. All values were expressed as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Tukey test. A *P* value  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### **Effect of native CRP (nCRP) on human macrophage LPL protein expression and secretion**

Incubation of macrophages with nCRP (0-5  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours increased, in a dose-dependent manner, LPL protein expression (Fig. 1A). LPL induction was evident at 1  $\mu\text{g/ml}$  and reached a maximum at 3  $\mu\text{g/ml}$  nCRP (Fig.1A) No further increase in macrophage LPL expression was noticed with nCRP concentrations exceeding 5  $\mu\text{g/ml}$  (LPL protein levels [% of control values]: nCRP (5  $\mu\text{g/ml}$ ): $180\pm 20$ ,  $P<0.001$ ; nCRP (10  $\mu\text{g/ml}$ ):  $180\pm 16$ ,  $P<0.001$ ; nCRP (25  $\mu\text{g/ml}$ ):  $160\pm 8$ ,  $P<0.001$ ; nCRP (50  $\mu\text{g/ml}$ ):  $173\pm 12$ ,  $P<0.001$ ). Both nCRP and dialyzed CRP preparations showed equivalent ability to induce macrophage LPL protein expression, whereas  $\text{NaN}_3$  alone, at concentration equivalent to 3  $\mu\text{g/ml}$  nCRP (0.00015%), did not affect this parameter (data not shown). Induction of macrophage LPL by nCRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ) was time-dependent, being observed from 12 to 72 hours with maximal effect at 24 hours (Fig.1B). Recovery of enhanced heparin-releasable LPL activity reflected the increase in intracellular LPL protein levels in nCRP-treated human macrophages (Fig.1C). Induction of LPL activity was prevented by heat inactivation of CRP (Fig.1C).

To compare the biological effects of native and mCRP, LPL protein expression was determined in macrophages treated for 6 to 24 hours with 3  $\mu\text{g/ml}$  nCRP or mCRP. Although both CRP preparations significantly increased macrophage LPL protein expression at 12 and 24 hours, mCRP was more potent at 12 hours (Fig. 2A). In

contrast, nCRP and mCRP did not differ in their ability to induce LPL secretion at 12 and 24 hours (Fig. 2B)

**CRP effect on human macrophage LPL protein expression is mediated by FcγRII receptors**

Since CRP binds to FcγRI and FcγRII receptors on vascular cells, we next evaluated whether CRP binding to these receptors is involved in the stimulatory effect of CRP on macrophage LPL expression. Pretreatment of human macrophages for 1 hour with antibody to CD32 prevented the effect of nCRP on macrophage LPL protein expression, whereas preincubation of the cells with antibody to CD64 had no effect (Fig. 3). Addition of the irrelevant murine anti-IgG<sub>1</sub> antibody did not affect this parameter (LPL protein levels [% of control values]: anti-IgG<sub>1</sub> antibody (10 μg/ml):117±17,  $P>0.05$ ). An anti-CD16, but not an anti-CD32 antibody, reduced the mCRP effects (extracellular LPL activity [% of control value]: mCRP (3 μg/ml):150±5,  $P<0.001$ ; anti-CD16 (5 μg/ml) + mCRP:116 ± 3; anti-CD32+mCRP:143 ± 5,  $P<0.01$ ).

**Role of oxidative stress and PKC on CRP-stimulated human macrophage LPL protein expression**

Exposure of human macrophages to CRP (3 μg/ml) led to a significant increase of intracellular ROS generation, as assessed by DCF-DA (Fig. 4A). Pretreatment of the cells with vitamin E (50 μmol/l), N-acetylcysteine (NAC) (10 mmol/l) or an antibody to CD32 (5 μg/ml) abolished this effect (Fig.4A). Exposure of unstimulated cells to these compounds did not affect basal DCF fluorescence (data not shown).

Incubation of human macrophages with vitamin E (50  $\mu\text{mol/l}$ ) or NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) prevented the stimulatory effect of CRP on LPL protein expression (Fig. 4B). These compounds and the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (Apo) (10  $\mu\text{mol/l}$ ) also abolished the effect of CRP on LPL secretion (Fig. 4C).

To examine the involvement of the PKC pathway in the effect of CRP on macrophage LPL expression, total cell lysates were analyzed for the presence of conventional PKC isoforms. Incubation of macrophages with CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ) for 10 min increased the expression of PKC- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_{II}$  and - $\gamma$  by -2.7, -2.2, -1.9 and -1.8 fold, respectively (Fig. 5A). Next, the effect of the pan-specific and conventional PKC inhibitors, calphostin C (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) and GF109203X (20  $\text{nmol/l}$ ) on CRP-induced LPL expression was determined. Pretreatment of macrophages with these compounds, totally abolished the stimulatory effect of CRP on macrophage LPL protein expression (Fig.5B) and secretion (Fig.5C). Inhibition of CRP-induced LPL secretion was further observed following incubation of macrophages with the myristoylated peptide inhibitor of PKC $\alpha$  and  $\beta$  (50 $\mu\text{mol/l}$ ) and the PKC $\beta$  inhibitor, LY379196 (20 $\text{nmol/l}$ ) (Fig.5C).

### **Role of ERK in CRP-induced human macrophage LPL protein expression**

To determine the role of the ERK pathway in the regulation of macrophage LPL by CRP, human macrophages were incubated for 1 hour with PD98059 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) or U0126 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) prior exposure to CRP. Pretreatment of the cells with these inhibitors totally abolished CRP-induced macrophage LPL protein expression and secretion (Fig. 6A, B). Exposure of unstimulated cells to PD98059 and U0126 did



not affect basal LPL protein levels or activity (data not shown). To further ascertain the involvement of the ERK1/2 pathway in CRP-treated macrophages, these cells were treated with CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ) for 0-30 min and the expression level of phosphospecific ERK 1/2 was determined by immunoblot analysis. Treatment of macrophages with CRP induced ERK 1/2 phosphorylation in a time-dependent manner with peak activation occurring at 10 min. This effect was completely abrogated by prior incubation of the cells with calphostin C or GF109203X (Fig.6C). Under these conditions, no modulation of total cellular ERK, used as control, was observed (Fig. 6C).

#### **Effect of glucose on CRP-induced macrophage LPL secretion**

The effect of CRP on LPL secretion was further studied in high glucose-treated human macrophages. As reported earlier (22), incubation of macrophages in a high glucose environment led to increased macrophage LPL expression. Addition of CRP did not further increase LPL secretion under hyperglycemic conditions (extracellular LPL activity [% of control value]: CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ): $140\pm6$ ,  $P<0.05$ ; glucose (20mM): $140\pm6$ ,  $P<0.05$ ; CRP+glucose:  $147 \pm 8$ ,  $P<0.05$ ).

#### **Effect of CRP on murine macrophage LPL expression. Role of oxidative stress, PKC and MAPK**

Given the limited amount of biological material that can be obtained from human macrophages, the molecular mechanisms involved in CRP-induced LPL expression were studied in the J774 murine macrophage cell line. To ascertain the validity of this model, LPL protein and gene expression were first measured in

CRP-treated J774 macrophages. Incubation of murine macrophages with native CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours significantly increased macrophage LPL protein expression (LPL protein levels [% increase over control values]: CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ):  $210 \pm 22$ ,  $P < 0.001$ ). Stimulation of J774 macrophages for 24 hours with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP also significantly increased LPL mRNA expression in these cells. This effect was sustained up to 72 hours (Fig.7A). Under these experimental conditions, no modulation of GAPDH, used as an internal control, was observed (Fig.7A). Pretreatment of murine macrophages with NAC, PKC, MAPK and AP-1 inhibitors abolished the stimulatory effect of CRP on macrophage LPL gene expression (Fig. 7B).

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

Finally, to determine if incubation of macrophages with CRP could result in changes at the level of LPL gene binding proteins, the binding activity of nuclear proteins extracted from CRP-treated J774 macrophages to the AP-1 consensus sequence of the LPL gene promoter was analyzed. Electrophoretic mobility shift assay showed that a 24 hours incubation time of these cells with CRP led to an increased binding of nuclear proteins to the AP-1 regulatory sequence of the LPL gene promoter. This binding complex was specifically competed in the presence of a 1,000-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide. Pretreatment with PKC, MAPK and AP-1 inhibitors as well as with the antioxidant NAC, prevented the enhanced binding of nuclear proteins to AP-1 (Fig. 8).

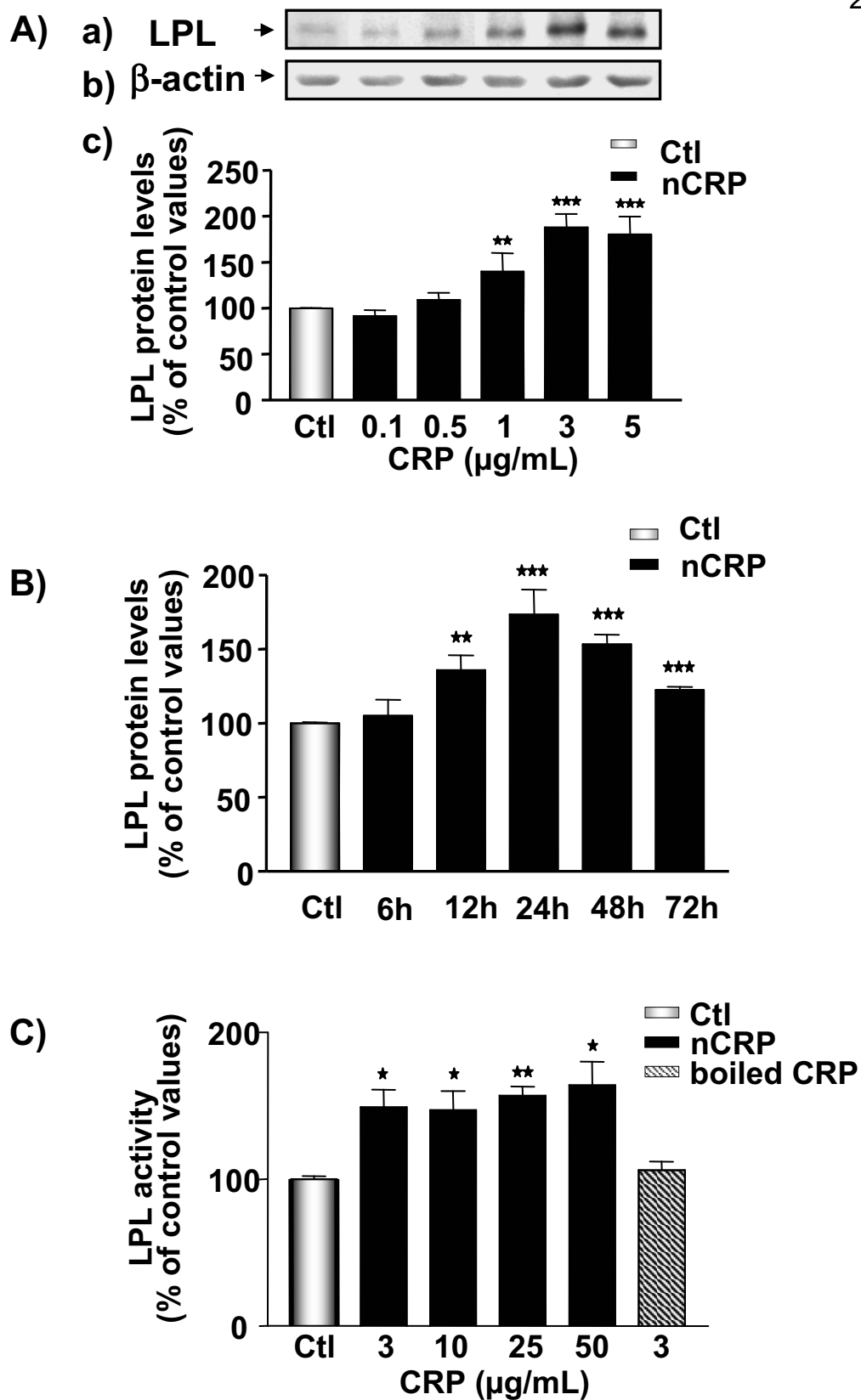
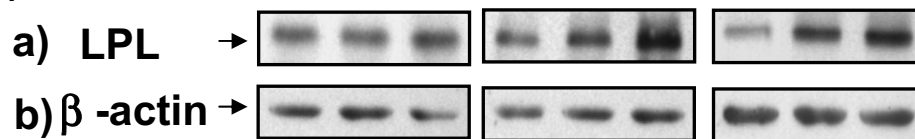
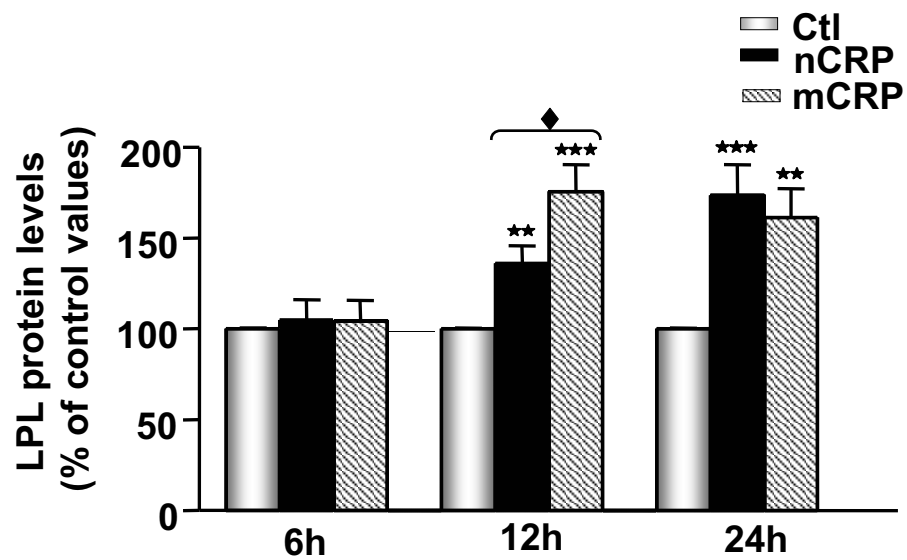


Fig. 1. Effect of nCRP on human macrophage LPL protein expression and secretion. Human macrophages were incubated for 24 h with endotoxin-free nCRP (0-5  $\mu\text{g/ml}$ ) (A) or for 6 to 72 h with 3  $\mu\text{g/ml}$  nCRP (B). At the end of these incubation periods, cells were lysed and LPL protein expression was determined by Western blot analysis. LPL protein levels were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein. (C) Human macrophages were incubated for 24 h with nCRP (0-50 $\mu\text{g/ml}$ ) or boiled CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ). Extracellular LPL activity was determined as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P$ <0.05 vs. Ctl, \*\* $P$ <0.01 vs. Ctl, \*\*\* $P$ <0.001 vs. Ctl.

A)



c)



B)

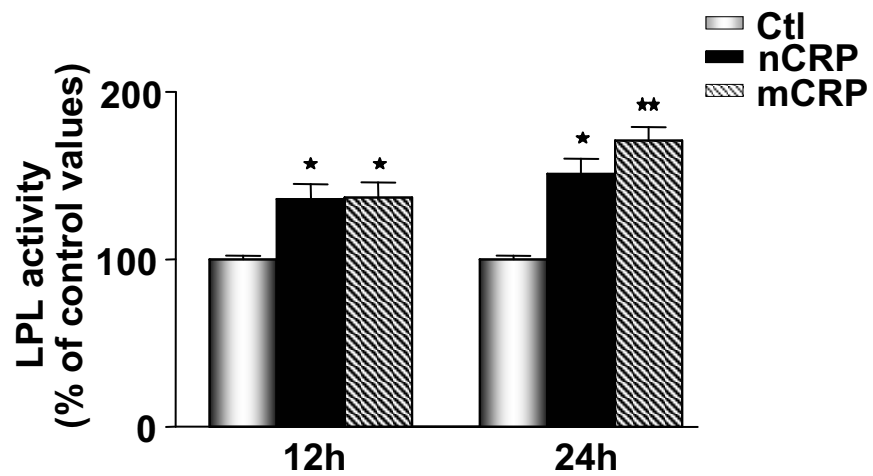


Fig. 2. Effect of nCRP vs. mCRP on human macrophage LPL protein expression and secretion. (A) Human macrophages were incubated for 6 to 24 h with nCRP or mCRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ). At the end of these incubation periods, cells were lysed and LPL protein expression was determined by Western blot analysis. LPL protein levels were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein. (B) Human macrophages were incubated for 12 to 24 h with nCRP or mCRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ). Extracellular LPL activity was determined as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P < 0.05$  vs. Ctl, \*\* $P < 0.01$  vs. Ctl, \*\*\* $P < 0.001$  vs. Ctl,  $\blacklozenge P < 0.05$  vs. nCRP.

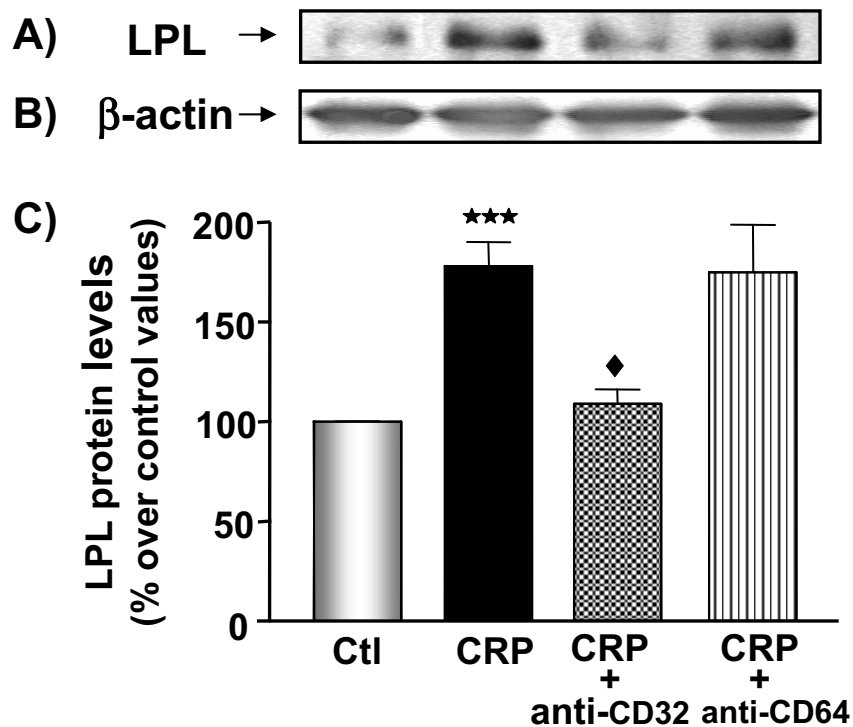


Fig. 3. Role of Fc $\gamma$ RII receptor on CRP-induced human macrophage LPL protein expression. Human macrophages were preincubated for 1 h with antibody against CD32 (5  $\mu$ g/ml) or CD64 (5  $\mu$ g/ml) and then incubated for 24 h with 3  $\mu$ g/ml CRP. At the end of this incubation period, cells were lysed and LPL protein expression was determined by Western blot analysis. LPL protein levels were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein. Data are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \*\*\*\* $P$ <0.001 vs. Ctl,  $\blacklozenge$  $P$ <0.05 vs. CRP.

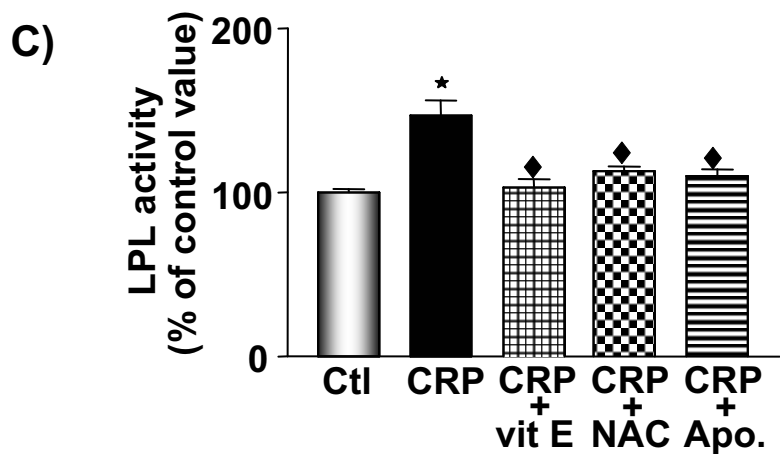
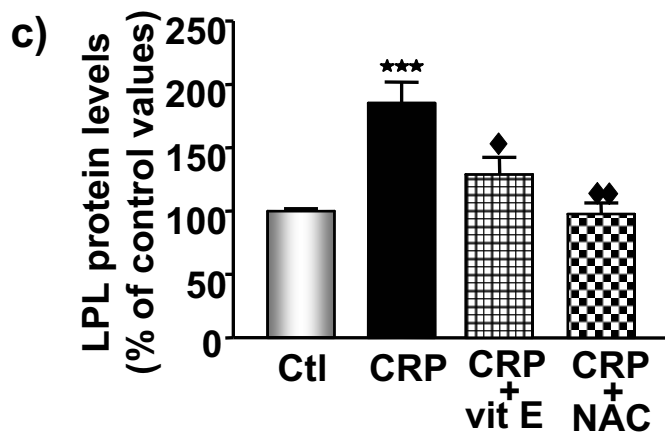
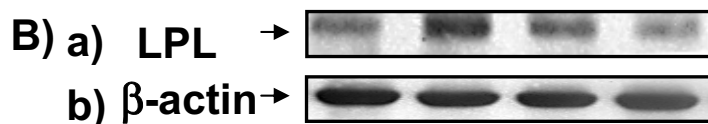
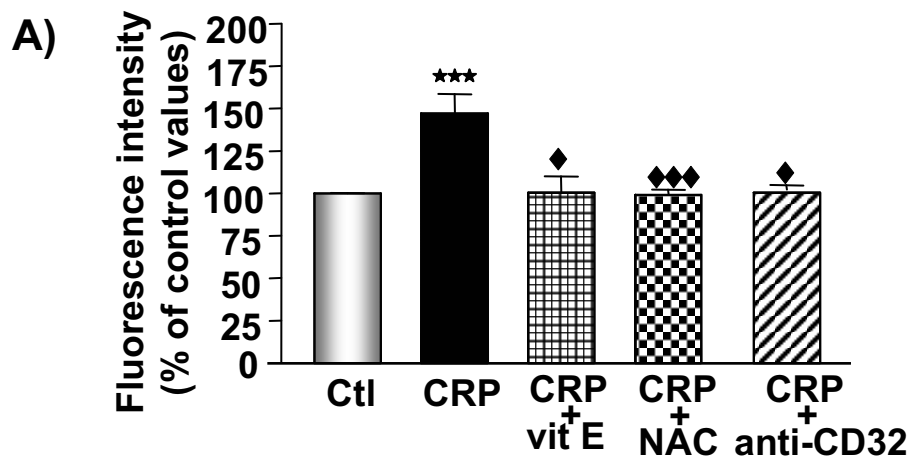




Fig. 4. Role of oxidative stress on CRP-stimulated human macrophage LPL expression and secretion. (A) Human macrophages were preincubated for 1 h with vitamin E (vit E) (50  $\mu\text{mol/l}$ ), NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) or an antibody against CD32 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) then treated for 1 h with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP and intracellular ROS generation was measured. Results are reported as percent of control values. (B) Human macrophages were preincubated for 1 h with vitamin E (vit E) (50  $\mu\text{mol/l}$ ) or NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) prior to exposition to CRP (3  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 h. At the end of this incubation period, cells were lysed and LPL protein expression was determined by Western blot analysis. LPL protein levels were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein. (C) Human macrophages were preincubated for 1 h with vitamin E (vit E) (50  $\mu\text{mol/l}$ ), NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) or apocynin (10  $\text{mmol/l}$ ) then treated for 1 h with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP. Extracellular LPL activity was determined as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments. \* $P < 0.05$  vs. Ctl, \*\*\* $P < 0.001$  vs. Ctl,  $\blacklozenge P < 0.05$  vs. CRP,  $\blacklozenge\blacklozenge P < 0.01$  vs. CRP,  $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge P < 0.001$  vs. CRP.

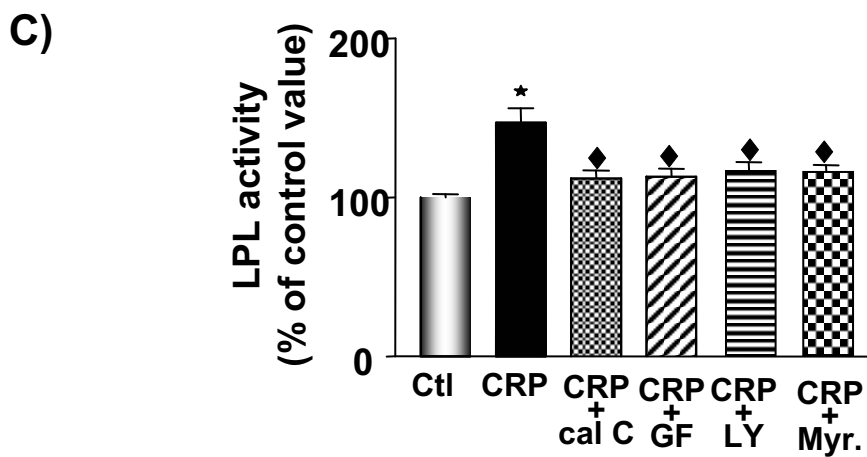
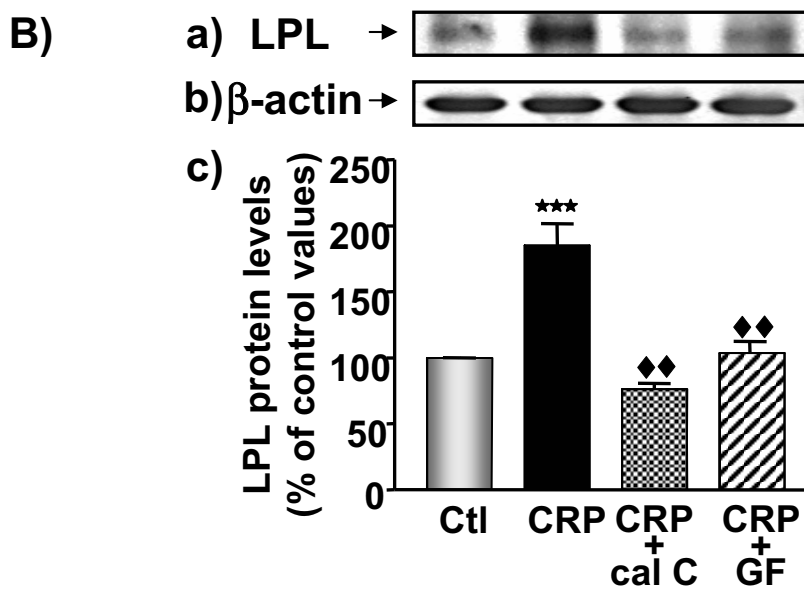
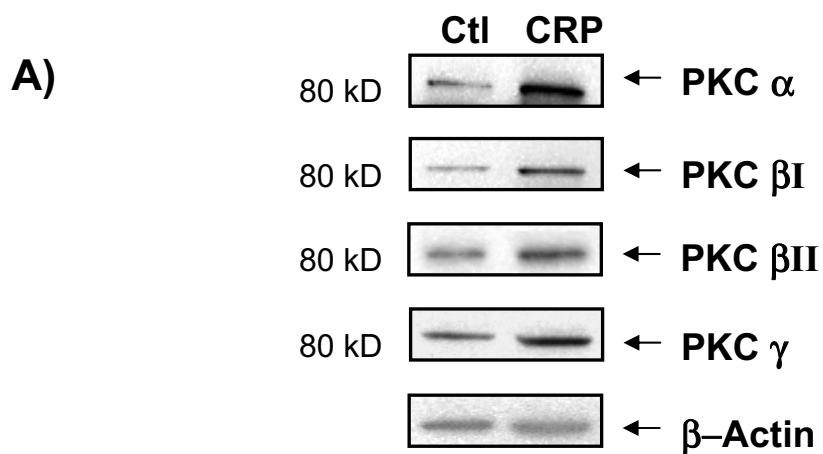


Fig. 5. Role of PKC on CRP-stimulated human macrophage LPL expression and secretion. (A) (A) Human macrophages were incubated with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP for 10 min. Whole cell protein extracts were assayed for conventional PKC isoforms. Fig. 4A illustrates the results of one representative experiment out of 3. (B) Human macrophages were preincubated for 1 h with calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) or GF109203X (GF) (20 nmol/l) prior to incubation with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP for 24 h. At the end of this incubation period, cells were lysed and LPL protein expression was determined by Western blot analysis. LPL protein levels were normalized to the levels of  $\beta$ -actin protein. (C) Human macrophages were preincubated for 1 h with calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), GF109203X (GF) (20 nmol/l), LY379196 (LY) (20nmol/l) or the myristoylated peptide inhibitor of PKCa/b (Myr) (50 mmol/l) prior to incubation with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP for 24 h. Extracellular LPL activity was determined as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments. \* $P$ <0.05 vs. Ctl, \*\*\* $P$ <0.001 vs. Ctl,  $\blacklozenge$  $P$ <0.05 vs. CRP,  $\blacklozenge\blacklozenge$  $P$ <0.01 vs. CRP.

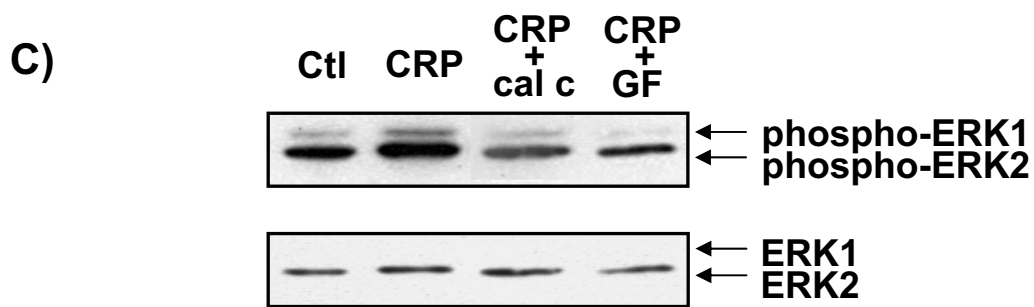
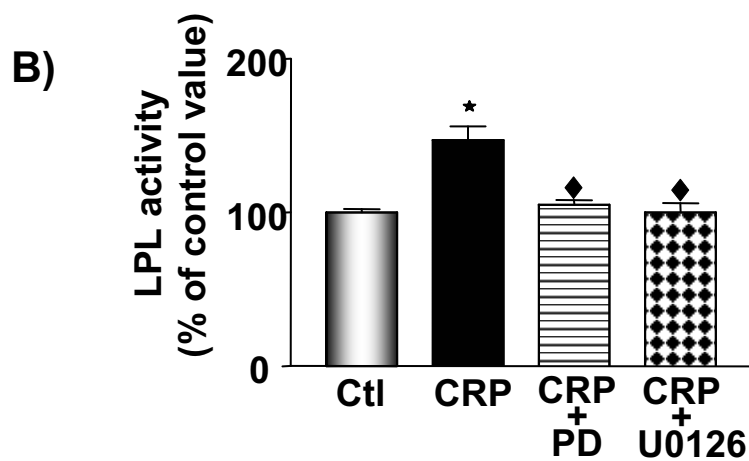
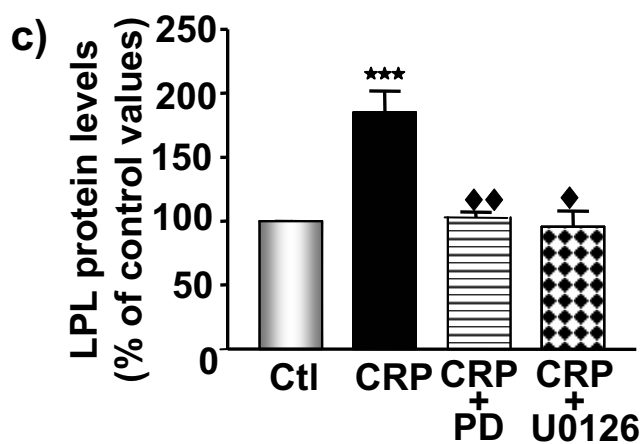
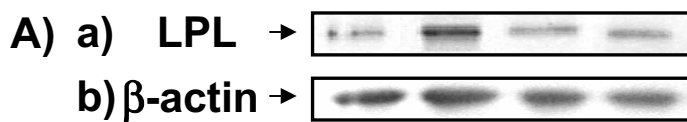


Fig. 6. Role of MAPK on CRP-induced human macrophage LPL expression and secretion. Human macrophages were preincubated for 1 h with PD98059 (PD) (10  $\mu\text{mol/l}$ ) or U0126 (20  $\mu\text{mol/l}$ ), then treated for 24 h with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP. At the end of this incubation period, LPL protein expression (A) and extracellular LPL activity (B) were determined. Data are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P < 0.05$  vs Ctl, \*\*\* $P < 0.001$  vs. Ctl,  $\blacklozenge P < 0.05$  vs. CRP,  $\blacklozenge\blacklozenge P < 0.01$  vs. CRP. (C) Human macrophages were preincubated for 1 h with calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) or GF109203X (GF) (20  $\text{nmol/l}$ ) then treated for 10 min with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP. Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) phosphorylation was assessed by Western blot using phospho-specific or specific ERK1/2 antibodies. One representative blot is shown.

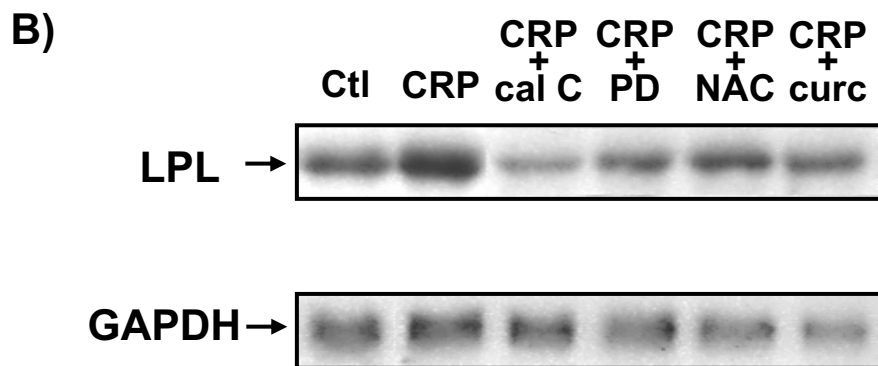
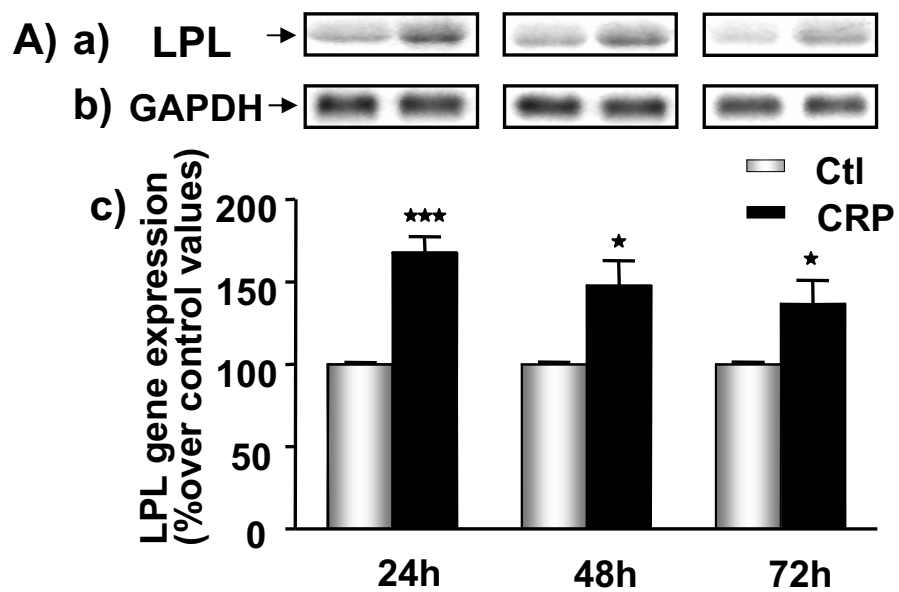


Fig. 7. Effect of CRP on murine macrophage LPL gene expression. Role of oxidative stress, PKC and MAPK (A) J774 cells were incubated for 24-72 h with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP. At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analysed by Northern blot analysis for LPL (a) and GAPDH (b) mRNA expression. Levels of LPL mRNA were normalized to the levels of GAPDH mRNA (c). Results are means  $\pm$  SEM of 4 different experiments, \* $P < 0.05$  vs Ctl, \*\*\* $P < 0.001$  vs. Ctl. (B) J774 cells were preincubated for 1 h in the presence of calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), PD98059 (PD) (10  $\mu\text{mol/l}$ ), NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) or curcumin (curc) (10  $\mu\text{mol/l}$ ), then treated for 24 h with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP. At the end of these incubation periods, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL (upper panel) and GAPDH (lower panel) mRNA expression. Representative blots from 3 independent experiments are shown.

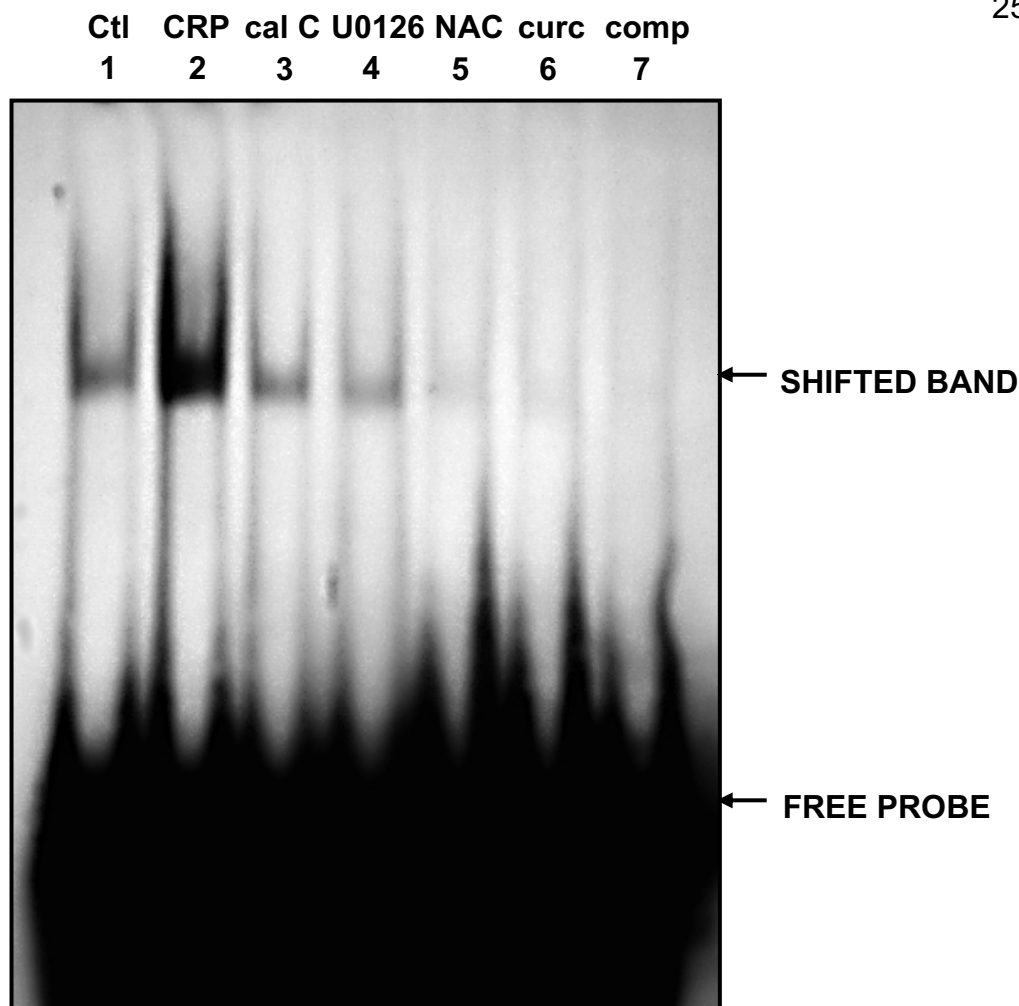


Fig. 8. Effect of CRP on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the LPL gene promoter. J774 cells were incubated with 3  $\mu\text{g/ml}$  CRP for 24 h in the presence or absence of calphostin C (cal C) (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), U0126 (20  $\mu\text{mol/l}$ ), NAC (10  $\text{mmol/l}$ ) or curcumin (curc) (10  $\mu\text{mol/l}$ ). 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% PAGE. Figure shows one representative experiment out of 3. Lane 1: untreated cells; lane 2: CRP-treated cells; lane 3: CRP + calphostin C; lane 4: CRP + U0126; lane 5: CRP +NAC; lane 6: CRP + curcumin; lane 7: competition of the CRP-induced binding complex in the presence of 1000-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide.



## DISCUSSION

Due to its ability to promote foam cell formation (15), macrophage LPL has been identified as a potential target for intervention and its regulation has been the subject of extensive investigation. We have previously demonstrated that macrophage LPL is upregulated in patients with type 2 diabetes (18) and have proposed a role for peripheral factors, including glucose, in this alteration (19, 20, 21, 22, 23).

In addition of being a predictor of CV risk in patients with type 2 diabetes (24), CRP may further contribute to the development of atherosclerosis. Arguing for this hypothesis, CRP has been reported to stimulate vascular cells to secrete a vast array of inflammatory factors (25).

Data presented here demonstrate for the first time that CRP, at concentrations associated with increased CV risk (26) and commonly observed in diabetic patients (27), enhances the expression of macrophage LPL. This effect remained unchanged by hyperglycemia, suggesting that CRP and glucose operate through common molecular mechanisms to induce LPL. Because endotoxin is a well known macrophage LPL inhibitory factor (28), endotoxin contamination of the CRP preparation may not account for this effect. Our findings that low CRP concentrations induce optimal macrophage LPL expression compare well with the results of previous studies showing that a triggering signal provided by a 1 to 10  $\mu\text{g/ml}$  CRP induces maximal macrophage tumoricidal activity, MMP-9 expression, CSF and interleukin-1 alpha production (5, 7, 8, 10).

It has been previously suggested that conformational changes in CRP are required for expression of biological functions (29,30). Our data which demonstrate that mCRP induces to a greater extent than nCRP LPL protein expression at 12 hours underscore the potential biological significance of mCRP in the regulation of macrophage LPL expression. These results along with our observation that both forms of CRP are equally effective in stimulating macrophage LPL at 24 hours support the notion that CRP effect on macrophage LPL might depend, at least in part, on the conversion of nCRP to mCRP. Although this may be true, nCRP may also regulate, by its own, macrophage LPL expression. Supporting this possibility, we found that both forms of CRP stimulate to the same extent macrophage LPL activity at 12 and 24 hours. The relevance of mCRP to atherosclerosis is unknown. While its presence in lesions is still disputed, *in vivo* and *in vitro* studies have substantiated discordant effects of mCRP in atherogenesis (29-31). Whether these opposing results result at least in part from differences in the long-term versus acute effect of the protein remains to be clarified.

In contrast to mCRP, nCRP has been identified in the arterial plaque (4) where it co-localizes with macrophage-derived foam cells (32). Because vessel wall LPL is proatherogenic and is involved in foam cell formation, induction of macrophage LPL by nCRP may represent a new molecular mechanism by which this protein induces proatherogenic effects and favors macrophage lipoprotein uptake.

Several lines of evidence suggest that CRP concentrations in the atherosclerotic lesion might exceed serum levels. Hence, it was important to

assess the regulatory effect of CRP concentrations exceeding CV risk on macrophage LPL expression. Our finding that CRP, at concentrations ranging from 10 to 50  $\mu\text{g/ml}$ , significantly enhances macrophage LPL expression and activity in vitro support the relevance of our observations to atherogenesis.

Many studies have demonstrated the presence of CRP receptors on mononuclear cells. Although nCRP can bind Fc $\gamma$ RI (CD64) receptors on human monocytes (33), Fc $\gamma$ RII (CD32) has been shown to be the major receptor for nCRP on these cells (34). Consistent with these findings, our results demonstrate that preincubation of human macrophages with Fc $\gamma$ RII but not Fc $\gamma$ RI antibody, prevented nCRP-induced macrophage LPL protein expression. In contrast to nCRP, the actions of mCRP appear to be mediated predominantly through CD16 (29,30). Consistent with this possibility, our data indicate that induction of LPL by CRP is reduced by an anti-CD16 antibody. Since this antibody did not produce complete reversal of mCRP effects, other as yet unidentified cell surface receptors might be involved.

Macrophage LPL induction in response to CRP appears to be exerted at the transcriptional level as reflected by the parallel increase in LPL gene and protein expression. Transcriptional activation of the LPL gene by CRP may theoretically involve AP-1. Indeed, an AP-1-responsive element has been located in the regulatory sequence of the LPL gene (35) and increased AP-1 activation has been documented in CRP-treated vascular smooth muscle cells (36). Supporting this hypothesis, our results demonstrate that curcumin, a non specific inhibitor of the

transcriptional activity of AP-1, inhibits CRP-induced macrophage LPL mRNA levels and that CRP stimulates nuclear protein binding to the AP-1 sequence of the LPL gene. Although these observations would suggest the involvement of AP-1 in the induction of macrophage LPL by CRP, further studies using a molecular dominant strategy are needed to confirm this possibility. These data along with our previous observations showing the involvement of AP-1 in the induction of macrophage LPL by several factors dysregulated in diabetes (19, 20, 22, 23) further stress the key role of this transcription factor in the regulation of macrophage LPL gene expression in human diabetes.

Human diabetes represents a state of heightened oxidative stress and oxidative events are known to be closely related to inflammation. Evidence has been provided that functional activation of CD32 by CRP is linked to ROS production and proinflammatory effects in vascular cells (37,38) and that macrophage LPL expression is upregulated by oxidative stress (39). In addition, a role for oxidative stress in the inhibitory effect of CRP on macrophage cholesterol efflux has been recently demonstrated (40). Consistent with a key role of oxidative stress in the regulatory effect of CRP on macrophage LPL, our results demonstrate that CRP increased intracellular ROS generation in human macrophages and that antioxidants prevented the stimulatory effect of CRP on macrophage LPL expression. NADPH oxidase is a major source of ROS in vascular cells and is upregulated in CRP-treated THP-1 foam-like cells (40). Our observation that incubation of human macrophages with apocynin blocks CRP-induced LPL secretion support a role for NADPH oxidase in this effect.

PKC and MAPK are implicated in the pathogenesis of diabetic vasculopathies and ROS are well known activators of these kinases. We have previously demonstrated that PKC activation and PKC-dependent-MAPK activation are major participants in the regulation of macrophage LPL (19-20, 22-23). While indirect evidence has been provided for a role of PKC in CRP-induced platelet adhesion and VCAM-1 expression (41-42), the levels of PKC activity in CRP-treated vascular cells has not been documented yet. In the present study, we demonstrated that CRP increases the expression of conventional PKC isoforms in macrophages. Our results showing that induction of LPL by CRP can be blocked by a pseudosubstrate PKC $\alpha/\beta$  inhibitor and a PKC $\beta$  inhibitor, LY379196, support a role for PKC $\beta$  as signaling molecule mediating the stimulatory effect of CRP on macrophage LPL. Numerous studies have shown that MAPK, and particularly ERK1/2, are implicated in the activation of vascular cells by CRP (36, 43-48). In accordance with previous studies showing a rapid activation of ERK1/2 after CRP stimulation of endothelial cells (48), we found that CRP induced ERK1/2 phosphorylation in macrophages. That inhibition of the ERK pathway totally abolished CRP-induced macrophage LPL expression, both at the gene and protein levels, indicate that activation of these kinases is required for the stimulatory effect of CRP on macrophage LPL. Several lines of evidence indicate that PKC activates the MAPK signal transduction (49-50). Consistent with these results, we found that PKC inhibition abolished CRP-induced ERK1/2 activation in macrophages, thus identifying MAPK as a downstream target of PKC in these cells. Previous studies

have demonstrated that PKC and MAPK can act as mediators of AP-1 activation (51-52). On the basis of our results showing that antioxidants, as well as PKC/MAPK inhibitors prevented the activation of the AP-1 transcription factor by CRP, we propose a model in which CRP, by increasing ROS production, leads to the activation of PKC/MAPK pathways and the subsequent activation of AP-1 in macrophages.

A vast literature has been generated in the last few years and it all points toward the critical role that CRP plays in all stages of cardiovascular disease. The role of CRP as evolved from just a marker of cardiovascular risk to an active player in the atherosclerotic process. Even though this later role is still being questioned (53-54), our results add weight to the growing number of studies showing that CRP can directly activate vascular cells and further corroborate a role for CRP as an active player in the promotion of atherogenesis.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that CRP stimulates macrophage LPL expression and secretion in vitro. This effect is mediated through oxidative stress and appears to involve PKC and MAPK activation. These data suggest a new mechanism by which CRP may promote atherogenesis. Establishing whether the in vivo effect of CRP on macrophage function favors atherogenesis in humans is of clinical interest especially in patients with diabetes, who have increased serum CRP levels and demonstrate enhanced secretion of proatherogenic cytokines by macrophages, including LPL.

**REFERENCES**

1. Ziegler, D. 2005. Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder. *Curr. Mol. Med.* **5**:309-322.
2. Ridker, P. M., C. H. Hennekens, J. E. Buring, and N. Rifai. 2000. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med.* **342**:836-843.
3. Danesh, J., J. G. Wheeler, G. M. Hirschfield, S. Eda, G. Eiriksdottir, A. Rumley, G. D. Lowe, M. B. Pepys, and V. Gudnason. 2004. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **350**:1387-1397.
4. Yasojima, K., C. Schwab, E. G. McGeer, and P. L. McGeer. 2001. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* **158**:1039-1051.
5. Galve-de, R. B., K. Wiktorowicz, I. Kushner, and J. M. Dayer. 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.

6. Xie, L., L. Chang, Y. Guan, and X. Wang. 2005. C-reactive protein augments interleukin-8 secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46**:690-696.
7. Singh, P. P., S. Singh, G. P. Dutta, and N. B. Singh. 1995. C-reactive protein-induced colony-stimulating factors production by macrophages. *Eur. Cytokine Netw.* **6**:37-43.
8. Abe, N., T. Osanai, T. Fujiwara, K. Kameda, T. Matsunaga, and K. Okumura. 2006. C-reactive protein-induced upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer in macrophages: inhibitory effect of fluvastatin. *Life Sci.* **78**:1021-1028.
9. Ratnam, S., and S. Mookerjea. 1998. The regulation of superoxide generation and nitric oxide synthesis by C-reactive protein. *Immunology* **94**:560-568.
10. Zahedi, K., and R. F. Mortensen. 1986. Macrophage tumoricidal activity induced by human C-reactive protein. *Cancer Res.* **46**:5077-5083.
11. Woollard, K. J., D. C. Phillips, and H. R. Griffiths. 2002. Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **130**:256-262.



12. Fu, T., and J. Borensztajn. 2002. Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem. J.* **366**:195-201.
13. Clee, S. M., N. Bissada, F. Miao, L. Miao, A. D. Marais, H. E. Henderson, P. Steures, J. McManus, B. McManus, R. C. LeBoeuf, J. J. Kastelein, and M. R. Hayden. 2000. Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **41**:521-531.
14. Mead, J. R., A. Cryer, and D. P. Ramji. 1999. Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett.* **462**:1-6.
15. Babaev, V. R., S. Fazio, L. A. Gleaves, K. J. Carter, C. F. Semenkovich, and M. F. Linton. 1999. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J. Clin. Invest* **103**:1697-1705.
16. Beauchamp, M. C., E. Letendre, and G. Renier. 2002. Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **43**:215-222.
17. Serri, O., L. Li, F. Maingrette, N. Jaffry, and G. Renier. 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.

18. Sartippour, M. R., and G. Renier. 2000. Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: role of peripheral factors. *Diabetes* **49**:597-602.
19. Beauchamp, M. C., and G. Renier. 2002. Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-Fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes* **51**:1180-1187.
20. Beauchamp, M. C., S. E. Michaud, L. Li, M. R. Sartippour, and G. Renier. 2004. Advanced glycation end products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression. *J. Lipid Res.* **45**:1749-1757.
21. Michaud, S. E., and G. Renier. 2001. Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes* **50**:660-666.
22. Sartippour, M. R., A. Lambert, M. Laframboise, P. St-Jacques, and G. Renier. 1998. Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* **47**:431-438.

23. Maingrette, F., and G. Renier. 2003. Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes* **52**:2121-2128.
24. Schulze, M. B., E. B. Rimm, T. Li, N. Rifai, M. J. Stampfer, and F. B. Hu. 2004. C-reactive protein and incident cardiovascular events among men with diabetes. *Diabetes Care* **27**:889-894.
25. Paffen, E., and M. P. DeMaat. 2006. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc. Res.* **71**:30-39.
26. Pearson, T. A., G. A. Mensah, R. W. Alexander, J. L. Anderson, R. O. Cannon, III, M. Criqui, Y. Y. Fadd, S. P. Fortmann, Y. Hong, G. L. Myers, N. Rifai, S. C. Smith, Jr., K. Taubert, R. P. Tracy, and F. Vinicor. 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* **107**:499-511.
27. Kahn, S. E., B. Zinman, S. M. Haffner, M. C. O'Neill, B. G. Kravitz, D. Yu, M. I. Freed, W. H. Herman, R. R. Holman, N. P. Jones, J. M. Lachin, and G. C. Viberti. 2006. Obesity is a major determinant of the association of C-reactive

protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes* **55**:2357-2364.

28. White, J. R., A. Chait, S. J. Klebanoff, S. Deeb, and J. D. Brunzell. 1988. Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumor necrosis factor. *J. Lipid Res.* **29**:1379-1385.
29. Khreiss, T., L. Jozsef, L. A. Potempa, and J. G. Filep. 2004. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* **109**:2016-2022.
30. Khreiss, T., L. Jozsef, L. A. Potempa, and J. G. Filep. 2005. Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circ Res* **97**:690-697.
31. Schwedler S. B., K. Amann, K. Wernicke, A. Krebs, M. Nauck, C. Wanner, L.A. Potempa, and J. Galle. 2005. Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* **112**:1016-1023.

32. Zhang, Y. X., W. J. Cliff, G. I. Schoefl, and G. Higgins. 1999. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **145**:375-379.
33. Crowell, R. E., T. W. Du Clos, G. Montoya, E. Heaphy, and C. Mold. 1991. C-reactive protein receptors on the human monocytic cell line U-937. Evidence for additional binding to Fc gamma RI. *J. Immunol.* **147**:3445-3451.
34. Bharadwaj, D., M. P. Stein, M. Volzer, C. Mold, and T. W. Du Clos. 1999. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J. Exp. Med.* **190**:585-590.
35. Hua, X. X., S. Enerback, J. Hudson, K. Youkhana, and 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.
36. Hattori, Y., M. Matsumura, and K. Kasai. 2003. Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc. Res.* **58**:186-195.
37. Venugopal S. K., J. Devaraj and S. Jialal. 2003. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation* **108**:1676-1678.

38. Ryu, J., C. W. Lee, J. A. Shin, C. S. Park, J. J. Kim, S. J. Park, and K. H. Han. 2007. Fc $\gamma$ R1a mediates C-reactive protein-induced inflammatory responses of human vascular smooth muscle cells by activating NADPH oxidase 4. *Cardiovasc. Res.* **75**:555-565.
39. Renier, G., A. C. Desfaits, A. Lambert, and R. Mikhail. 1996. Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J. Lipid Res.* **37**:799-809.
40. Wang X, Liao D, Bharadwaj U, Li M, Yao Q, Chen C 2008. C-reactive protein inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb vasc Biol* **28**:519-526.
41. Kawanami, D., K. Maemura, N. Takeda, T. Harada, T. Nojiri, T. Saito, I. Manabe, Y. Imai, and R. Nagai. 2006. C-reactive protein induces VCAM-1 gene expression through NF- $\kappa$ B activation in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **185**:39-46.
42. Yaron, G., A. Brill, O. Dashevsky, I. M. Yosef-Levi, E. Grad, H. D. Danenberg, and D. Varon. 2006. C-reactive protein promotes platelet adhesion to endothelial cells: a potential pathway in atherothrombosis. *Br. J. Haematol.* **134**:426-431.

43. Cirillo, P., P. Golino, P. Calabro, G. Cali, M. Ragni, R. S. De, G. Cimmino, M. Pacileo, P. R. De, L. Forte, A. Gargiulo, F. G. Corigliano, V. Angri, R. Spagnuolo, L. Nitsch, and M. Chiariello. 2005. C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc. Res.* **68**:47-55.
44. Doronzo, G., I. Russo, L. Mattiello, M. Trovati, and G. Anfossi. 2005. C-reactive protein increases matrix metalloproteinase-2 expression and activity in cultured human vascular smooth muscle cells. *J. Lab Clin. Med.* **146**:287-298.
45. Kibayashi, E., M. Urakaze, C. Kobashi, M. Kishida, M. Takata, A. Sato, K. Yamazaki, and M. Kobayashi. 2005. Inhibitory effect of pitavastatin (NK-104) on the C-reactive-protein-induced interleukin-8 production in human aortic endothelial cells. *Clin. Sci. (Lond)* **108**:515-521.
46. Lim, M. Y., H. Wang, A. M. Kapoun, M. O'connell, G. O'Young, H. A. Brauer, G. R. Luedtke, S. Chakravarty, S. Dugar, G. S. Schreiner, A. A. Protter, and L. S. Higgins. 2004. p38 Inhibition attenuates the pro-inflammatory response to C-reactive protein by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**:1111-1114.

47. Montero, I., J. Orbe, N. Varo, O. Beloqui, J. I. Monreal, J. A. Rodriguez, J. Diez, P. Libby, and J. A. Paramo. 2006. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**:1369-1378.
48. Wang, Q., X. Zhu, Q. Xu, X. Ding, Y. E. Chen, and Q. Song. 2005. Effect of C-reactive protein on gene expression in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**:H1539-H1545.
49. Dent, P., W. D. Jarvis, M. J. Birrer, P. B. Fisher, R. K. Schmidt-Ullrich, and 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.
50. Hattori, Y., H. Kakishita, K. Akimoto, M. Matsumura, and 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.
51. Frost, J. A., T. D. Geppert, M. H. Cobb, and J. R. Feramisco. 1994. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the



activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:3844-3848.

52. Genot, E. M., P. J. Parker, and D. A. Cantrell. 1995. Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation. *J. Biol. Chem.* **270**:9833-9839.
53. Taylor, K. E., J. C. Giddings, and C. W. van den Berg. 2005. C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**:1225-1230.
54. Hirschfield, G. M., J. R. Gallimore, M. C. Kahan, W. L. Hutchinson, C. A. Sabin, G. M. Benson, A. P. Dhillon, G. A. Tennent, and M. B. Pepys. 2005. Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:8309-8314.

## III. Discussion

### III.1 Diabète de type 2 et MCV

Le diabète est un problème de santé majeur qui atteint des proportions pandémiques dans les pays industrialisés et en voie de développement. On estime que 150 millions d'individus sont affectés par cette maladie à travers le monde et de ce nombre, environ 90% sont atteints de diabète de type 2 (Grundy et al., 2002). 80% de ces individus sont également obèses et l'obésité, tout particulièrement l'obésité abdominale, ainsi que l'inactivité physique sont deux des plus importants facteurs impliqués dans le développement du diabète de type 2. Au cours des deux dernières décennies, on a assisté à une explosion alarmante des cas d'obésité, entre autres chez les jeunes enfants, et cette augmentation s'est faite parallèlement à celle du diabète de type 2.

Les MCV sont beaucoup plus fréquentes et surviennent à un âge plus précoce chez les patients diabétiques de type 2 que dans la population générale (Laing et al., 2003). Le diabète de type 2 est associé à une augmentation de 2 à 4 fois du risque de morbidité et de mortalité associées aux MCV (Harris, 1998). Ainsi, les sujets diabétiques de type 2 ayant subi un infarctus du myocarde présentent une augmentation du risque de récurrence ainsi qu'une augmentation du risque de mortalité lors d'un prochain infarctus (Miettinen et al., 1998). Plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire associés au diabète de type 2 tels que la dyslipidémie, l'hypertension, le tabagisme, l'obésité et l'hyperglycémie, ont été

identifiés (section I.2.7.1). L'hyperglycémie, notamment, a longtemps été considérée, pour des raisons évidentes, comme le déterminant majeur des complications vasculaires associées au diabète de type 2 (Massi-Benedetti & Federici, 1999; Orchard, 1999). Bien que les complications micro-vasculaires soient clairement attribuables à l'hyperglycémie, le rôle de celle-ci, ou plutôt son degré d'implication, dans le développement des complications macro-vasculaires n'est pas aussi clair et reste jusqu'à aujourd'hui fortement controversé. L'étude UKPDS, une importante étude de cohorte effectuée chez plus de 5000 sujets diabétiques, n'a pas rapporté de diminution significative des complications macro-vasculaires chez ces patients suite à un contrôle glycémique agressif (1998b). Si cette étude supporte néanmoins un rôle du contrôle glycémique comme possible facteur de risque de MCV, de récentes données épidémiologiques soutiennent plutôt un rôle des excursions hyperglycémiques post-prandiales dans la genèse de l'athérosclérose associée au diabète (Gerich, 2006; Ceriello, 2005).

Il semble donc que les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels associés au diabète de type 2 dont nous avons précédemment parlé, n'expliquent qu'en partie l'augmentation du risque de MCV associée à cette pathologie. Les mécanismes responsables de cette prévalence accrue d'athérosclérose chez les sujets diabétiques de type 2 n'ont donc pas été encore complètement élucidés. Le diabète de type 2 se caractérise par l'augmentation de divers facteurs proathérogéniques, tels que la LPL macrophagique et le LOX-1. L'augmentation

d'expression de ces deux facteurs dans cette pathologie traduit leur implication potentielle dans la vasculopathie diabétique.

### **III.2 Importance de la LPL macrophagique dans le processus athéromateux**

Les macrophages jouent un rôle majeur dans l'initiation et la progression du processus athérosclérotique. La formation de cellules spumeuses, par la captation de lipoprotéines modifiées par les macrophages et l'accumulation de cholestéryl esters dans ces cellules, est une étape clé du processus athéromateux se produisant de manière accélérée dans le diabète (Dobrian et al., 2000). Les cellules spumeuses sont présentes à tous les stades de l'athérosclérose et elles jouent un rôle important dans l'initiation et la progression de la lésion athéromateuse.

La LPL macrophagique est impliquée dans le développement précoce de la lésion athéromateuse. En effet, la LPL via son activité lipolytique et son rôle de ligand athérogénique, favorise la formation de cellules spumeuses. Il a été observé que les macrophages, et plus particulièrement les cellules spumeuses, constituent la principale source de production de la LPL dans les lésions athérosclérotiques (O'Brien et al., 1992) et il a également été observé que des souris surexprimant la LPL macrophagique présentent une susceptibilité accrue à l'athérosclérose comparativement à des souris résistantes à la maladie (Renier et al., 1993). Récemment, de nombreuses études menées chez l'animal, sont venues

corroborés les travaux antérieurs ayant démontré le rôle pro-athérogénique de la LPL macrophagique (Babaev et al., 2000; Ichikawa et al., 2005; Van et al., 2000; Wilson et al., 2001; Wu et al., 2006). Pris dans leur ensemble, ces travaux soulignent le rôle clé joué par la LPL macrophagique dans l'athérogénèse.

### **III.2.1 Régulation de la LPL macrophagique par la leptine**

Notre laboratoire a démontré que les sujets diabétiques de type 2 surexpriment la LPL macrophagique (Sartippour et al., 2000) et que des facteurs métaboliques altérés dans le diabète, tels que le glucose (Sartippour et al., 1998), les acides gras (Michaud et al., 2001), l'Hcys (Beauchamp et al., 2002) et les AGE (Beauchamp et al., 2004), augmentent son expression. La leptine est une molécule pro-inflammatoire et immuno-modulatrice dont les concentrations sont augmentées dans le diabète de type 2 et prédisent un risque accru de développer un diabète de type 2 et des MCV (Beltowski, 2006). Dans cette première étude, nous avons évalué l'effet direct de la leptine sur l'expression de la LPL macrophagique in vitro.

Nos résultats démontrent dans un premier temps une augmentation concomitante des niveaux d'ARNm, du taux de synthèse et de la sécrétion de la LPL macrophagique en réponse à la leptine. Ces données, ainsi que nos résultats indiquant un effet stimulant de la leptine sur la liaison des protéines nucléaires à la séquence AP-1 du promoteur du gène de la LPL, suggèrent fortement que la

régulation de la LPL macrophagique par la leptine s'exerce au niveau transcriptionnel.

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, le stress oxydatif joue un rôle majeur dans le diabète de type 2. Nos résultats démontrant que le NAC prévient l'augmentation de la LPL macrophagique par la leptine indiquent clairement que cette induction est dépendante du stress oxydatif, tel qu'illustré à la Figure 8. Il existe plusieurs sources potentielles de ROS dans le système cardiovasculaire, incluant la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la chaîne respiratoire mitochondriale. Les mécanismes impliqués dans l'effet pro-oxydant de la leptine ont récemment été étudiés. Il a été démontré que la leptine, en augmentant l'expression d'iNOS dans les macrophages, induit un stress oxydatif en générant de grandes quantités de NO (Raso et al., 2002). Des études *in vitro* ont aussi suggéré l'implication de la NADPH oxydase (Dong, Zhang, & Ren, 2006; Li et al., 2005) et de la chaîne respiratoire mitochondriale (Yamagishi et al., 2001) dans l'augmentation de la production de ROS par la leptine. Le rôle de la NADPH oxydase dans l'induction du stress oxydatif par la leptine a également été documenté *in vivo* (Beltowski, Wojcicka, Jamroz-Wisniewska, Borkowska, & Marciniak, 2005). Récemment, il a été démontré que la leptine augmentait la NADPH oxydase dans des cardiomyocytes murins (Dong et al., 2006), augmentation atténuée par des antagonistes du récepteur de l'ET-1. Ces résultats et les données démontrant un effet stimulant de la leptine sur la production d'ET-1 dans les cardiomyocytes (Xu et al., 2004) et les cellules endothéliales

(Quehenberger et al., 2002), suggèrent que la leptine puisse stimuler la formation des ROS par des voies de signalisation dépendante de la NADPH oxydase et de l'ET-1. S'il n'existe pas de données sur la régulation de la LPL macrophagique par l'ET-1, 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, Desfaits, Lambert, & Mikhail, 1996)

Bien que l'implication de la NADPH oxydase dans la régulation de la LPL n'ait pas été vérifiée et que nous n'ayons pas déterminé dans notre étude les mécanismes responsables de l'augmentation de ROS par la leptine, il est tentant de spéculer, en se basant sur ces études, que la NADPH oxydase puisse être impliquée dans l'effet stimulant de la leptine sur la LPL macrophagique. Une façon simple de vérifier cette possibilité serait 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 la leptine, par l'ajout d'antioxydants ou d'inhibiteurs de la NADPH oxydase.

Outre l'implication des ROS en tant que médiateurs des effets de la leptine sur la LPL macrophagique, nos études antérieures ont démontré le rôle crucial de la PKC dans la régulation de la LPL macrophagique dans la vasculopathie diabétique (Beauchamp et al., 2002; Beauchamp et al., 2004; Sartippour et al., 1998). En accord avec ces dernières études, nos résultats démontrent que la leptine augmente l'expression des isoformes classiques de la PKC et la liaison des protéines nucléaires à la séquence AP-1 du gène de la LPL, comme on peut le voir

à la Figure 8. Au vu du rôle de la PKC dans l'activation d'AP-1 (Genot, Parker, & Cantrell, 1995) et de l'implication de ce facteur de transcription dans la régulation de la LPL macrophagique (Sartippour et al., 1998; Beauchamp et al., 2002; Beauchamp et al., 2004), ces résultats suggèrent que la leptine puisse activer AP-1 de manière PKC-dépendante. Outre AP-1, divers autres facteurs de transcription, tels les PPARs et le NF-kB, ont été impliqués dans les effets régulateurs de la leptine sur la fonction macrophagique (Bouloumie et al., 1999; Cabrero et al., 2005; Aleffi et al., 2005; Lappas, Permezel, & Rice, 2005). Il est intéressant de mentionner que Cabrero et coll. (Cabrero et al., 2005) ont démontré que la leptine diminuait les niveaux d'ARNm de PPAR $\gamma$  dans les macrophages humains. Ce facteur de transcription étant un régulateur clé de l'efflux du cholestérol dans les macrophages, sa réduction par la leptine a été proposée comme un mécanisme contribuant aux effets délétères de la leptine sur la fonction vasculaire. Il a été également rapporté que la leptine pouvait activer le facteur de transcription NF-kB (Bouloumie et al., 1999; Aleffi et al., 2005; Lappas et al., 2005). 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 par la leptine.

Comme la PKC, l'implication des MAPK dans la régulation de la LPL macrophagique a été peu étudiée, une seule étude rapportant son rôle dans le contrôle de la LPL par les AGEs (Beauchamp et al., 2004). Malgré le rôle bien documenté des MAPK dans la vasculopathie diabétique et les résultats de



plusieurs études récentes démontrant leur activation par la leptine (Li et al., 2005; Napoleone et al., 2007; Shen, Sakaida, Uchida, Terai, & Okita, 2005; Singh et al., 2007; Wojcicka, Jamroz-Wisniewska, Widomska, Ksiazek, & Beltowski, 2008; Zhao et al., 2005), nos résultats démontrant que l'inhibition pharmacologique des MAPK est sans effet sur la stimulation par la leptine de la liaison des protéines nucléaires à la séquence AP-1 du gène de la LPL, ne nous permettent pas d'appuyer un rôle de ces kinases dans l'effet stimulant de la leptine sur la LPL macrophagique.

À la lumière de nos résultats démontrant que la leptine régule in vitro l'expression de la LPL macrophagique via le récepteur Ob-R, il serait important de déterminer dans le futur le rôle de ce récepteur dans l'augmentation de la LPL macrophagique documentée chez les patients diabétiques de type 2. Initialement, une détermination du niveau d'expression macrophagique du récepteur Ob-R chez des sujets atteints de diabète de type 2 pourrait être envisagée. Par la suite, la sensibilité des macrophages isolés de sujets diabétiques à la leptine pourrait être mesurée. Une augmentation du niveau d'expression de ce récepteur et/ou une sensibilité accrue des macrophages diabétiques à la leptine pourrait contribuer à l'augmentation d'expression de la LPL macrophagique dans le diabète de type 2. Au vu du rôle de la leptine dans l'activation macrophagique et de l'expression du récepteur Ob-R par les macrophages présents dans la lésion athéromateuse (Kang et al., 2000; Santos-Alvarez, Goberna, & Sanchez-Margalet, 1999), l'établissement d'un lien entre production de LPL et niveau d'expression

macrophagique du récepteur Ob-R, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans la prévention et le traitement des MCV chez les diabétiques de type 2.

Tel que mentionné plus haut, la leptine semble réguler de manière directe l'expression de la LPL macrophagique. La leptine pouvant augmenter l'expression macrophagique de divers facteurs susceptibles d'influencer l'expression de LPL, un rôle de ces facteurs dans l'effet régulateur de la leptine sur la LPL ne peut cependant être exclus. Parmi les facteurs induits par la leptine et susceptibles d'influencer la production de LPL, on note le  $TNF\alpha$  (Shen et al., 2005; Zhao et al., 2005) et la CRP (Canavan et al., 2005; Chen et al., 2006a; Hukshorn et al., 2002; Singh et al., 2007). Puisque le  $TNF\alpha$  diminue l'expression génique et l'activité de la LPL macrophagique (Tengku-Muhammad et al., 1996), un rôle de cette cytokine à titre de médiateur de l'effet stimulant de la leptine sur la LPL macrophagique est d'emblée exclus. La CRP pourrait par contre jouer ce rôle. En effet il a été démontré que l'administration de leptine à des individus sains, augmentait leurs concentrations plasmatiques de CRP (Canavan et al., 2005 ; Hukshorn et al., 2002) et une corrélation positive a été documentée entre les concentrations plasmatiques de leptine et de CRP chez l'homme (Ble et al., 2005; Shamsuzzaman et al., 2004). En outre un effet stimulant de la leptine sur les niveaux d'expression de CRP dans des adipocytes humains en culture a été rapporté (Chen et al., 2006a). Finalement, Singh et coll. (Singh et al., 2007) ont récemment démontré que la leptine, à des concentrations observées chez les sujets obèses et diabétiques, augmentait l'expression de CRP par les cellules endothéliales vasculaires. Ces résultats et

ceux de notre étude, où nous avons démontré que la CRP induit l'expression de la LPL macrophagique *in vitro*, suggèrent un possible effet médiateur de la CRP sur l'augmentation d'expression de la LPL macrophagique par la leptine. Aucune étude ne s'étant encore attardée à étudier la production de CRP macrophagique par la leptine, une façon simple de vérifier cette hypothèse serait, dans un premier temps, de mesurer les niveaux d'expression de la CRP par des macrophages traités par la leptine et ensuite de vérifier l'implication de la CRP dans l'induction de la LPL macrophagique par la leptine en exposant les cellules à un anticorps dirigé contre la CRP.

Finalement, nos résultats démontrent que la leptine produit ses effets maximaux sur la production de LPL macrophagique à des doses physiologiques et fréquemment observées chez les individus obèses et diabétiques (Considine et al., 1996; Nyholm, Fisker, Lund, Moller, & Schmitz, 1997). Ainsi, nous avons observé que la leptine augmente l'expression de la LPL macrophagique de manière maximale à des doses de 2 nmol/L dans les macrophages humains et à 4 nmol/L dans les macrophages murins. Cette variation pourrait être due à une différence de sensibilité de ces deux types de macrophages à la leptine. Alternativement une différence de niveau d'expression des récepteurs Ob-R entre ces cellules pourrait être impliquée. À l'encontre de notre étude réalisée avec des doses faibles de leptine, la plupart des autres études portant sur les effets modulateurs de la leptine sur la fonction macrophagique ont utilisé des concentrations de leptine jusqu'à 50 fois plus élevées que celles utilisées dans notre étude (Cabrero et al., 2005;

Loffreda et al., 1998; Santos-Alvarez et al., 1999). Bien qu'il soit possible que les concentrations de leptine présentes dans la lésion athéromateuses puissent excéder celles présentes en périphérie, la pertinence de telles d'études dans le développement et la progression de l'athérosclérose reste à démontrer.

En résumé, cette première étude démontre que la leptine, à des concentrations semblables à celles rencontrées dans le plasma de sujets diabétiques, induit in vitro l'expression génique et la sécrétion de la LPL macrophagique. Cet effet semble être transcriptionnel et est médié par l'induction de stress oxydatif et l'activation de la PKC et d'AP-1, comme l'illustre la Figure 8. Ces données suggèrent un nouveau mécanisme par lequel la leptine pourrait favoriser le développement accéléré des MCV associées au diabète de type 2.

### **III.2.2 Régulation de la LPL macrophagique par la CRP**

Outre la leptine, la CRP est une autre molécule ayant des propriétés pro-inflammatoires et immuno-modulatrices dont les concentrations sont également augmentées dans le diabète de type 2 et constituent un puissant facteur de prédiction du diabète de type 2 (Pradhan et al., 2001) et du développement de MCV (Ridker et al., 2001). Nos études antérieures ayant démontré la surexpression de LPL macrophagique chez les sujets diabétiques de type 2 et le rôle joué par certains facteurs dysrégulés dans le diabète, telle la leptine, sur l'effet

observé, l'objectif de cette deuxième étude était de vérifier l'effet direct de la CRP sur l'expression de la LPL macrophagique.

En premier lieu, ayant préalablement démontré que le glucose augmente l'expression de la LPL macrophagique (Sartippour et al., 1998), nous avons examiné l'effet de la CRP sur la sécrétion de LPL macrophagique par des macrophages cultivés dans un milieu riche en glucose. Dans cette condition hyperglycémique, nous n'avons pas observé d'effet potentialisateur de la CRP sur l'induction de LPL macrophagique par le glucose, suggérant que la CRP et le glucose agissent via des voies de signalisation communes afin d'induire la sécrétion de LPL. Dès lors, nous avons examiné la possibilité que la régulation de la LPL macrophagique en réponse à la CRP puisse s'exercer au niveau transcriptionnel en se basant sur nos résultats précédents démontrant que le glucose stimulait l'expression de la LPL macrophagique à ce niveau (Sartippour et al., 1998). Nos résultats rapportant une augmentation parallèle des niveaux d'ARNm et des niveaux protéique de la LPL appuient cette possibilité.

Nous avons par la suite démontré que la CRP augmentait la production de ROS par les macrophages humains et que cet effet pouvait être prévenu en exposant ces cellules à des antioxydants tels que le NAC et la vitamine E. Bien que des études antérieures aient déjà démontré que la CRP induise la production des ROS dans les CML (Chang et al., 2005; Kobayashi et al., 2003), dans les PBMC (Xie, Chang, Guan, & Wang, 2005) et dans les cellules spumeuses (Wang et al., 2008), à notre connaissance, notre étude démontre pour la première fois que

la CRP peut augmenter la production de ROS dans les macrophages humains. En accord avec des données existant dans la littérature et démontrant un effet stimulant de la CRP sur l'activité de la NADPH oxydase dans les PBMC (Xie et al., 2005), nos résultats démontrant que l'inhibition pharmacologique de la NADPH oxydase inhibe l'effet stimulant de la CRP sur la sécrétion de la LPL macrophagique, laissent suggérer que la NADPH oxydase puisse être la principale source de ROS générés par la CRP dans les macrophages humains, comme le fait valoir la Figure 8.

Il a été rapporté que la PKC était sensible au stress oxydatif dans diverses cellules vasculaires incluant les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (Cathcart, 2004; Taher, Garcia, & Natarajan, 1993). Dans notre modèle, une façon simple de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activation de la PKC dans les macrophages est dépendante du stress oxydatif aurait été de pré-incuber les macrophages avec des antioxydants et de mesurer l'activité de la PKC en réponse à leur stimulation par la CRP. À ce sujet, l'activité de la PKC n'ayant pas été mesurée directement dans notre étude, l'on pourrait argumenter que l'augmentation d'expression des isoformes classiques de la PKC que nous avons documentée dans les macrophages traités par la CRP, ne signifie pas nécessairement qu'il y ait une augmentation de leur activité. Toutefois, l'activation des MAPK par la PKC requérant une augmentation d'activité de la PKC et l'inhibition de cette kinase abolissant dans notre modèle expérimental l'activation

des MAPK par la CRP, un effet stimulant de la CRP sur l'activité de la PKC semble raisonnablement pouvoir être proposé.

Plusieurs études suggèrent l'importance de l'activation de certains isoformes spécifiques de la PKC, principalement  $\alpha$ ,  $\beta$ 1/2 et  $\gamma$  dans la physiopathologie des complications micro- et macro-vasculaires associées au diabète de type 2 (Rask-Madsen & King, 2005; Das & King, 2007). Les isoformes  $\alpha$ , et  $\beta$ 1/2 sont notamment activés de façon préférentielle dans les macrophages exposés à des concentrations élevées en glucose (Li, Sawamura, & Renier, 2004; Devaraj, Venugopal, Singh, & Jialal, 2005). Par ailleurs, un inhibiteur spécifique des isoformes  $\beta$  de la PKC, le LY333531 ou ruboxistaurin (RBX), s'est avéré efficace dans le traitement des anomalies rétiniennes et rénales chez des animaux et des patients diabétiques (Das et al., 2007). En effet, l'administration de RBX à des patients diabétiques diminue de manière significative la perte d'acuité visuelle en normalisant le flux sanguin de la rétine et en diminuant l'œdème maculaire chez ces patients (Aiello et al., 2006a; Aiello et al., 2006b; Davis et al., 2008). Le RBX aurait également des effets bénéfiques sur la néphropathie diabétique en diminuant la protéinurie et la filtration glomérulaire chez des patients diabétiques de type 1 et 2 (Tuttle et al., 2005). Finalement, Beckman et coll. (Beckman, Goldfine, Gordon, Garrett, & Creager, 2002) ont démontré un effet bénéfique du RBX sur la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie chez l'humain. En accord avec ces données, nos résultats démontrant qu'un pseudosubstrat inhibiteur de PKC $\alpha/\beta$  (Myr) et un inhibiteur de PKC $\beta$  (LY379196), préviennent l'effet stimulant

de la CRP sur l'expression de la LPL macrophagique, mettent en lumière le rôle clé joué par les isoformes  $\beta$  de la PKC dans la régulation de la LPL macrophagique par la CRP.

En accord avec le rôle d'AP-1 dans l'induction de la LPL macrophagique par divers facteurs métaboliques altérés dans le diabète (Beauchamp et al., 2002; Beauchamp et al., 2004; Sartippour et al., 1998), nos données démontrent un rôle de ce facteur de transcription dans la régulation de la LPL macrophagique par la CRP. Ces résultats renforcent le rôle clé d'AP-1 dans la régulation du gène de la LPL macrophagique dans le diabète. À la lueur de nos résultats démontrant l'abolition de l'induction d'AP-1 en présence d'antioxydants et d'inhibiteurs de la PKC et des MAPK, nous proposons un modèle, tel qu'illustré à la Figure 8, selon lequel la CRP, en augmentant la production de ROS, stimulerait de manière séquentielle les voies de signalisation PKC/MAPK puis l'activation du facteur AP-1 avec pour résultat une augmentation de la transcription du gène de la LPL.

Tel que mentionné préalablement pour la leptine, il est possible que la CRP puisse réguler la production de LPL macrophagique via la production de certains facteurs sécrétés par le macrophage. La CRP peut induire la sécrétion d'IL-6, d'IL-8, d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  par les PBMC (Lim et al., 2004) mais tel que nous l'avons discuté antérieurement aucune de ces cytokines n'induit la LPL macrophagique et elles ne peuvent donc pas être considérées comme des médiateurs potentiels de l'effet stimulant de la CRP sur la LPL macrophagique. Au vu de nos données antérieures démontrant un rôle de l'ET-1 dans l'augmentation



d'expression macrophagique de LOX-1 par la CRP (Li et al., 2004), il serait pertinent de vérifier éventuellement l'implication de ce facteur dans la régulation de la LPL macrophagique par la CRP

Il est intéressant de noter que la présence de CRP dans l'intima d'artères coronaires présentant des signes d'athérosclérose précoces et que son expression à la surface des cellules spumeuses sont bien documentés (Torzewski et al., 1998). De manière pertinente, l'expression de CRP dans la paroi artérielle semble précéder l'infiltration de monocytes dans l'espace sous endothélial et un rôle de cette protéine dans le recrutement des monocytes a été suggéré (Torzewski et al., 1998) (Han et al., 2004). La CRP a aussi été impliquée dans la formation de cellules spumeuses par sa capacité à augmenter la captation des LDL par les macrophages (Bharadwaj, Stein, Volzer, Mold, & Du Clos, 1999; Zwaka, Hombach, & Torzewski, 2001), à se lier aux agrégats de lipoprotéines (Fu et al., 2002; Zwaka et al., 2001) et à inhiber l'efflux de cholestérol des cellules spumeuses (Wang et al., 2008). Dans notre étude, nous avons démontré que la CRP augmentait l'expression de la LPL macrophagique. Au regard du rôle critique de la LPL dans la captation de lipoprotéines par les macrophages, cet effet pourrait contribuer à l'action stimulante de la CRP sur la formation de cellules spumeuses, particulièrement dans le contexte du diabète.

Par ailleurs, l'implication des AGE dans la formation des cellules spumeuses est bien démontrée (Iwashima et al., 2000) et une augmentation des concentrations plasmatiques de RAGE et de CRP est documentée dans le diabète

et dans l'athérosclérose (Cipollone et al., 2003; Rodriguez-Moran & Guerrero-Romero, 1999). Ces données et l'étroite association entre les concentrations sériques de CRP et celles de AGE documentée dans le diabète de type 2 (Tan, Chow, Tam, Bucala, & Betteridge, 2004) suggèrent l'implication de ces deux molécules dans la progression de la vasculopathie diabétique. Alors que nous avons rapporté il y a quelques années que les AGE étaient impliqués dans la régulation de la LPL macrophagique (Beauchamp et al., 2004), Zhong et coll. (Zhong et al., 2006) ont récemment rapporté que la CRP induisait l'expression des RAGE dans les cellules endothéliales. À la lumière de ces données, il serait intéressant de déterminer si les AGE pourraient agir en tant que médiateur de l'action stimulante de la CRP sur la LPL et ainsi contribuer au rôle de la CRP dans la formation de cellules spumeuses. Pour vérifier cette hypothèse, on pourrait traiter des souris transgéniques surexprimant la CRP avec des anticorps dirigés contre les divers récepteurs à AGE exprimés par les macrophages humains (RAGE, SR-A, SR-B1, CD36, LOX-1) et mesurer les niveaux d'expression de la LPL macrophagique par rapport à des souris contrôle ne recevant pas ces anticorps.

La CRP a également été impliquée comme facteur causal de la dysfonction endothéliale et une corrélation est établie entre ses niveaux plasmatiques et ceux de divers marqueurs de dysfonction endothéliale (Verma et al., 2003; Yudkin et al., 1999). La CRP pourrait causer la dysfonction endothéliale par plusieurs mécanismes incluant l'augmentation d'expression des molécules d'adhésion et de

MCP-1, la diminution de NO, l'augmentation d'ET-1, de l'activité de iNOS et de la formation de peroxy-nitrites, l'activation du NF- $\kappa$ B et l'induction de LOX-1 (Verma et al., 2002b; Verma et al., 2002a; Li et al., 2004a; Szmitko et al., 2003; Schwedler et al., 2007). La LPL présente dans la paroi vasculaire et endothéliale semble aussi pouvoir causer la dysfonction endothéliale (Mamputu et al., 1997; Obunike et al., 1997; Wang et al., 2007). Par son activité catalytique, elle génère à la surface de l'endothélium des lipoprotéines athérogéniques et des acides gras libres qui peuvent activer et être cytotoxiques pour l'endothélium (Mead et al., 1999). Elle stimule de plus l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Mead et al., 2002a). Notre étude démontrant que la CRP augmente l'expression de la LPL macrophagique, suggère donc un nouveau mécanisme par lequel la CRP pourrait promouvoir la dysfonction endothéliale. Via l'induction de la LPL macrophagique, la CRP pourrait donc jouer un rôle clé dans les deux étapes les plus précoces dans le processus athéromateux, soit la formation de cellules spumeuses et la dysfonction endothéliale.

Finalement, il est important de noter que la CRP existe sous deux formes de configurations distinctes qui semblent affecter son potentiel athérogénique. En effet, la CRP sérique ou CRP native (nCRP) peut subir dans certaines conditions, telle qu'en présence d'agents chélateurs ou dans un environnement oxydant (Potempa, Siegel, Fiedel, Potempa, & Gewurz, 1987), une dissociation de sa forme pentamérique en sous-unités monomériques (Zouki, Haas, Chan, Potempa, & Filep, 2001). Ce changement de conformation produit la CRP monomérique ou

modifiée (mCRP) que l'on retrouve surtout dans les tissus fibreux et dans l'intima des vaisseaux sanguins chez l'humain (Diehl, Haines, III, Radosevich, & Potempa, 2000). Il a été suggéré que ce changement de configuration est nécessaire à la CRP pour exercer ses actions pro-inflammatoires (Khreiss, Jozsef, Potempa, & Filep, 2004). En accord avec cette hypothèse, nos résultats démontrent qu'après 12 heures d'exposition, l'expression protéique de la LPL macrophagique est induite de façon plus importante dans les macrophages exposés à la mCRP qu'à la nCRP. Par contre, après 24 heures d'exposition, cette différence n'est plus observable. Ceci suggère que l'effet de la CRP est dû, du moins en partie, à la conversion de nCRP en mCRP. Alternativement, nos données démontrant que les deux formes de CRP stimulent de façon similaire l'activité de la LPL macrophagique, supportent la possibilité que la nCRP puisse, par elle-même, moduler l'expression de la LPL macrophagique.

Il existe encore beaucoup de controverse quant au potentiel athérogénique de chaque isoforme et particulièrement quant au rôle joué par la mCRP dans le processus athérosclérotique (Schwedler et al., 2005). Bien que des études in vitro aient démontré que cet isoforme possédait des propriétés pro-athérogéniques (Khreiss, Jozsef, Potempa, & Filep, 2004; Khreiss, Jozsef, Potempa, & Filep, 2005), deux récentes études, adressant plusieurs problèmes méthodologiques d'études antérieures, penchent plutôt en faveur d'un rôle pro-athérogénique pour la nCRP. L'isoforme modifié de la CRP s'est effectivement avéré sans effet sur la vasodilatation de l'endothélium ainsi que sur l'efflux de cholestérol des cellules

spumeuses, contrairement aux effets délétères de la nCRP sur ces deux processus (Schwedler et al., 2007; Wang et al., 2008). Somme toute, ces dernières études suggèrent le rôle prépondérant de la nCRP dans les effets pro-athérogéniques associés à cette molécule. Toutefois, nous sommes conscients que seul des études additionnelles, notamment in vivo, permettront de déterminer de manière définitive le rôle joué par les différents isoformes de la CRP ainsi que la pertinence de nos observations in vitro.

En résumé, cette deuxième étude démontre pour la première fois que la CRP, à des concentrations associées à une augmentation du risque de MCV, stimule in vitro l'expression génique et la sécrétion de la LPL macrophagique. Cette induction est 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 la CRP suggère un nouveau mécanisme par lequel cette molécule pourrait favoriser le développement accéléré de l'athérosclérose associée au diabète de type 2 et vient corroborer le rôle clé de la CRP dans l'athérogénèse.

Les mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la régulation de la LPL macrophagique en réponse à la CRP et à la leptine dans le diabète de type 2 sont illustrés à la figure 8.

### III.3 Importance de LOX-1 dans la dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est une étape précoce dans le processus athéromateux et elle y joue un rôle clé. La dysfonction endothéliale est présente chez les individus diabétiques de type 2, obèses et insulino-résistants et précède le développement du diabète de type 2 (Brunner et al., 2005).

Plusieurs molécules sont impliquées dans la dysfonction endothéliale. LOX-1 est un récepteur endothélial pour les LDLox récemment identifié et plusieurs études appuient le rôle de LOX-1 en tant que médiateur de la dysfonction endothéliale. Effectivement, plusieurs études démontrent que la liaison des LDLox à LOX-1 dans les cellules endothéliales génère des ROS, diminue le NO, active le NF-kB et induit l'apoptose des cellules endothéliales (Cominacini et al., 2000; Cominacini et al., 2001; Li et al., 2000b). LOX-1 joue également le rôle de molécule d'adhésion, favorisant l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Honjo et al., 2003; Li et al., 2002a). Divers facteurs métaboliques et inflammatoires impliqués dans la dysfonction endothéliale associée au diabète de type 2, tels que le glucose (Li et al., 2004b), les AGE (Chen et al., 2001) et la CRP (Li et al., 2004a), augmentent l'expression endothéliale de LOX-1. LA, un acide gras dont les concentrations sont augmentées dans toutes les sous-fractions des LDL des patients diabétiques et qui est bien caractérisé en tant que molécule pro-inflammatoire et pro-oxydative, induit l'activation et la dysfonction endothéliale. Dans cette dernière étude, nous avons évalué l'effet direct de LA sur l'expression

endothéliale de LOX-1 in vitro afin de déterminer si ce récepteur pourrait médier les effets délétères de LA sur l'endothélium.

### **III.3.1 Régulation endothéliale de LOX-1 par LA**

Il existe une action différentielle des acides gras sur la fonction endothéliale. L'acide oléique, contrairement à LA, aurait des propriétés antioxydantes et protégerait l'endothélium de l'activation et de la dysfonction endothéliale (Carluccio et al., 1999). Tel que mentionné précédemment, un apport adéquat d'acides gras aux cellules est fourni via les lipoprotéines. La composition en acides gras des lipoprotéines est influencée par différents facteurs, incluant l'apport en acides gras, le métabolisme et l'incorporation préférentielle de cet acide gras dans différentes sous-classes de lipoprotéines. LA est augmentée dans toutes les sous-classes de LDL dans le diabète de type 2 (Prescott, Owens, Collins, Johnson, & Tomkin, 1999). De plus l'activité de la LPL macrophagique est non seulement augmentée dans le diabète de type 2 (Sartippour et al., 2000) mais également par LA (Michaud et al., 2001). Ce qui pourrait suggérer, in vivo, une régulation paracrine par laquelle LA en augmentant l'activité de la LPL macrophagique augmenterait par le fait même, via l'action lipolytique de la LPL sur les lipoprotéines, sa propre libération à proximité de l'endothélium, lui permettant d'exercer ainsi ses effets délétères sur l'endothélium.

L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B joue un rôle clé dans l'expression génique des molécules pro-inflammatoires impliquées dans la dysfonction endothéliale et notre étude a démontré que LA augmente la liaison des protéines nucléaires à la séquence consensus NF- $\kappa$ B dans le promoteur du gène LOX-1. AP-1 est un autre facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes liés à l'inflammation et au stress oxydatif. Il a été démontré que LA peut être impliqué dans la régulation de ce facteur de transcription dans les cellules endothéliales (Reiterer, Toborek, & Hennig, 2004; Toborek et al., 2002). Par contre, bien que LOX-1 possède un site de liaison pour AP-1 dans son promoteur, nous n'avons pas observé d'activation de ce facteur de transcription par LA dans notre étude. Ceci suggère que l'activation de LOX-1 par LA implique principalement le NF- $\kappa$ B.

L'expression de LOX-1 est augmentée par le stress oxydatif et les molécules l'induisant (Sakurai & Sawamura, 2003). Il est maintenant bien établi que le stress oxydatif est augmenté dans le diabète de type 2 et jouerait un rôle clé dans la dysfonction endothéliale qui lui est associée (Wolff, Jiang, & Hunt, 1991; Sano, Umeda, Hashimoto, Nawata, & Utsumi, 1998). En outre, il est bien reconnu que LA augmente la production de ROS et d'hydroperoxydes lipidiques (Hennig et al., 1996; Toborek et al., 1997; Toborek et al., 2002; Turpeinen et al., 1998; Viswanathan et al., 2003) et diminue les concentrations intracellulaires de glutathion dans les cellules endothéliales (Hennig et al., 2000). En accord avec ces données, nous avons démontré que des antioxydants tels que le NAC et la



vitamine C, diminuent significativement l'expression de LOX-1 induite par LA dans les cellules endothéliales et que la NADPH oxydase est la principale source de ROS activée par LA dans les cellules endothéliales.

La voie de signalisation PKC est l'une des principales voies de signalisation impliquée dans les complications vasculaires diabétiques (Koya & King, 1998). L'activation de la PKC est documentée in vitro dans les cellules vasculaires exposées à des concentrations élevées en glucose et en AGL (Inoguchi et al., 2000), ainsi que in vivo dans l'aorte de rats diabétiques (Inoguchi et al., 1992). Nos résultats démontrant que des inhibiteurs de la PKC préviennent l'induction de LOX-1 par LA, appuient un rôle de la PKC dans cet effet. La PKC est une molécule de signalisation dont l'activation est sensible au stress oxydatif dans plusieurs cellules vasculaires, incluant les cellules endothéliales (Taher et al., 1993). En accord avec les données générées par Cury-Boaventura (Cury-Boaventura & Curi, 2005) montrant le rôle clé de la NADPH oxydase dans la génération de ROS par LA, nos résultats démontrent que la NADPH oxydase est la principale source de ROS activée par LA dans les cellules endothéliales. Vu le rôle de la PKC dans l'activation de NF- $\kappa$ B, nous postulons que LA, en activant le système NADPH oxydase, induit la production de ROS qui activent à leur tour la voie PKC/NF- $\kappa$ B, menant ultimement à l'induction de LOX-1, tel que représenté à la Figure 8.

Outre la PKC, les MAPK sont des molécules de signalisation impliquées de manière critique dans la dysfonction endothéliale associée au diabète (Li et al., 2003d; Liu, Schoenkerman, & Lowe, Jr., 2000; Nakagami et al., 2001). La famille des MAPK comprend les ERK 1/2, la JNK et la p38 MAPK. En phosphorylant les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1, elles jouent un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la mobilité et l'apoptose. Par ailleurs, les MAPK jouent un rôle dans plusieurs processus biologiques associés à l'activation de LOX-1, tels que l'adhésion des monocytes à l'endothélium, l'apoptose des cellules vasculaires et la diminution de la vasorelaxation de l'endothélium (Morawietz et al., 1999; Li et al., 2003d; Li et al., 2000a; Iwai-Kanai et al., 2001; Li et al., 2003b).

Hennig et coll. (Hennig et al., 2006) ont récemment démontré que LA induit ses effets pro-inflammatoires via l'activation des voies de signalisation PI3/Akt, ERK 1/2 et p38 MAPK dans les cellules endothéliales vasculaires. À la lumière de ces données qui n'étaient pas disponibles au moment de nos travaux, il est tentant de spéculer que les MAPK, et alternativement la voie PI3/Akt, pourraient jouer un rôle dans la régulation endothéliale de LOX-1 par le LA. Parmi les nombreuses cibles situées en aval de la PKC et susceptibles d'être activées dans le diabète humain, les MAPK constituent un important point de régulation des cellules vasculaires. Il a été démontré qu'une co-activation de la PKC et des MAPK survient dans des cellules maintenues dans un milieu riche en glucose (Haneda et al., 1995) et que la PKC peut activer les MAPK (Dent et al., 1998; Hattori, Kakishita,

Akimoto, Matsumura, & Kasai, 2001). Les MAPK étant situées en aval de la PKC et en amont du NF- $\kappa$ B, elles pourraient servir de molécules transmettant le signal d'activation de la PKC à LOX-1.

Alternativement, il demeure plausible que l'effet stimulant de LA sur l'expression endothéliale de LOX-1 que nous avons observé soit médié par certaines cytokines. Effectivement, LA peut augmenter l'expression de l'ET-1 par les CML (Kwok, Shih, Hwu, & Ho, 2000) et l'ET-1 est un facteur stimulant l'induction de LOX-1 au niveau endothélial (Morawietz et al., 2001). L'ET-1 est de plus un stimulant de la sécrétion de l'IL-6 (Browatzki, Schmidt, Kubler, & Kranzhofer, 2000) et de récentes études démontrent que LA augmente l'expression d'IL-6 par les cellules endothéliales (Reiterer et al., 2004; Meerarani, Smart, Toborek, Boissonneault, & Hennig, 2003). L'ET-1 et l'IL-6 pourraient donc théoriquement représenter des médiateurs des effets de LA que nous avons documenté sur l'expression endothéliale de LOX-1. Le TNF $\alpha$ , une cytokine dont l'implication dans la dysfonction endothéliale est clairement reconnue (Bhagat & Vallance, 1997; Kim et al., 2001a), est un autre médiateur potentiel des effets de LA sur LOX-1. En effet, le TNF $\alpha$  augmente l'expression de LOX-1 (Kume et al., 1998) et plusieurs études ont démontré que l'expression de TNF $\alpha$  est non seulement augmentée par LA dans les cellules endothéliales mais que le TNF $\alpha$  potentialise les effets délétères de LA sur l'endothélium (Hennig et al., 2000; Toborek et al., 1997; Toborek et al., 2002; Young et al., 1998).

Par ailleurs, l'adhésion accrue de leucocytes à l'endothélium activé constitue l'une des principales complications associées à la dysfonction endothéliale diabétique (Desfaits, Serri, & Renier, 1998). À cet effet, LOX-1 peut agir en tant que molécule d'adhésion pour les plaquettes activées et les cellules mononucléaires et ainsi contribuer au recrutement de cellules inflammatoires et à la thrombose vasculaire (Hayashida et al., 2002; Kakutani et al., 2000). À la lumière du rôle documenté de LOX-1 dans l'adhésion accrue de monocytes à l'endothélium en réponse au glucose (Li et al., 2003d) et des travaux de Rinker et coll. (Rinker et al., 2004), ayant démontré que LA augmente la déformation et l'adhésion des monocytes à l'endothélium, il serait important de vérifier si l'effet de LA sur l'adhésion des monocytes à l'endothélium pourrait être médié par LOX-1.

Finalement, une question d'importance majeure est celle relative à la pertinence biologique de nos observations. Les concentrations d'AGL auxquelles les cellules endothéliales sont exposées *in vivo* sont déterminées par leur concentration dans le plasma ou dans les lipoprotéines. *In vivo*, les concentrations plasmatiques d'AGL peuvent varier de 90 à 1200 $\mu$ M (Hennig et al., 2000). LA représente 15% des AGL circulants et la proportion en pourcentage occupée par LA dans les lipoprotéines telles que les VLDL et les LDL, avoisine les 17% et peut augmenter dans des états pathologiques inflammatoires comme le diabète (Prescott et al., 1999). À la lumière de ces données, la concentration de LA de 200 $\mu$ M utilisée dans notre étude se compare favorablement aux concentrations présentes *in vivo*. D'autre part, la plupart des AGL circulent liés à l'albumine et

dans des conditions physiologiques, le ratio AGL/albumine varie entre 0.15 à 4, la moyenne étant de 1 (Spector, 1975). Puisque ce facteur représente le principal déterminant de la captation cellulaire des AGL, notre ratio LA/albumine de 0.1 dans cette étude est physiologique.

En résumé, cette dernière étude démontre que LA stimule l'expression endothéliale de LOX-1 in vitro. Cet effet semble être transcriptionnel et est médié par l'induction de stress oxydatif et l'activation de la PKC et de NF- $\kappa$ B. La stimulation de LOX-1 par LA pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale associée au diabète de type 2.

Les mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la régulation de LOX-1 en réponse à LA dans le diabète de type 2 sont illustrés à la figure 8.

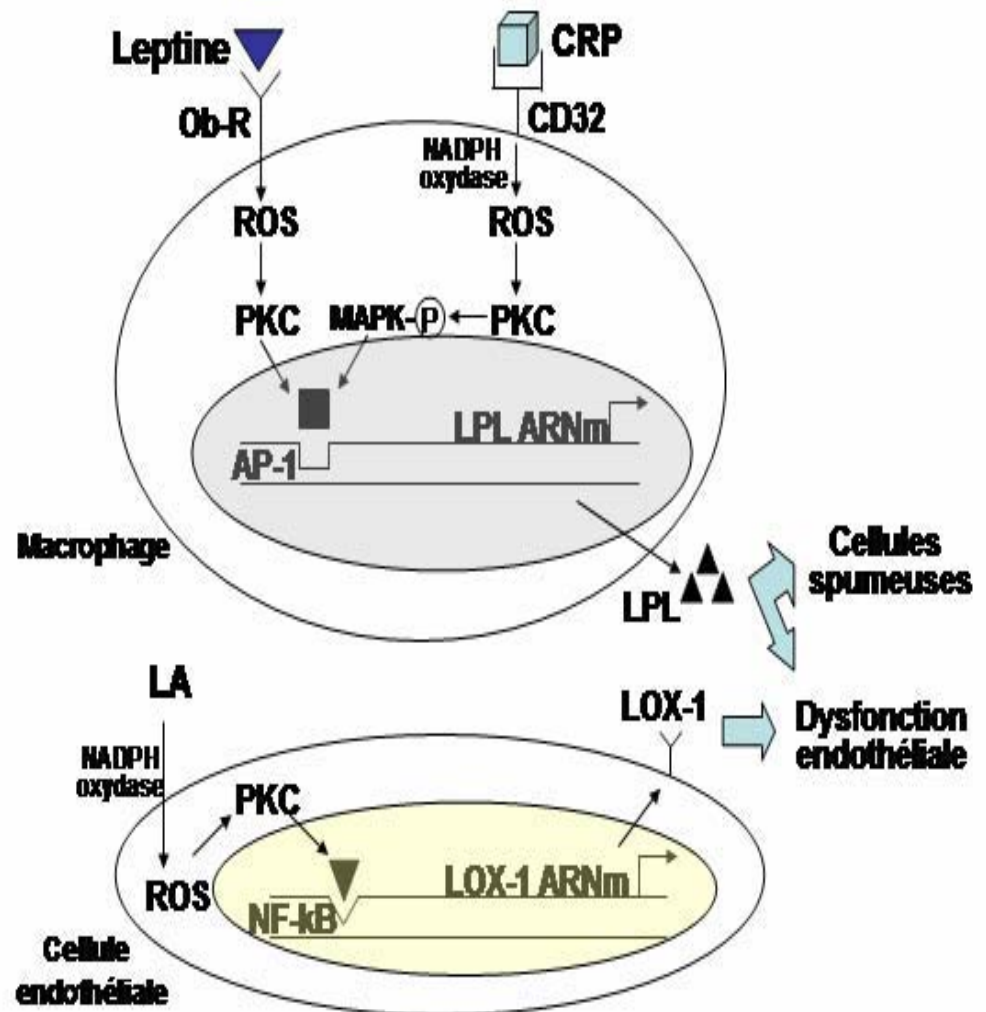


Figure 8. Mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression de la LPL macrophagique en réponse à la leptine et à la CRP et dans l'expression endothéliale de LOX-1 par LA dans le diabète de type 2.

La Figure 9 résume les interactions entre obésité, inflammation, IR et dysfonction endothéliale dans le contexte de la vasculopathie diabétique ainsi que le rôle qu'y joue les deux molécules examinées dans nos études, soit la LPL macrophagique et le LOX-1.

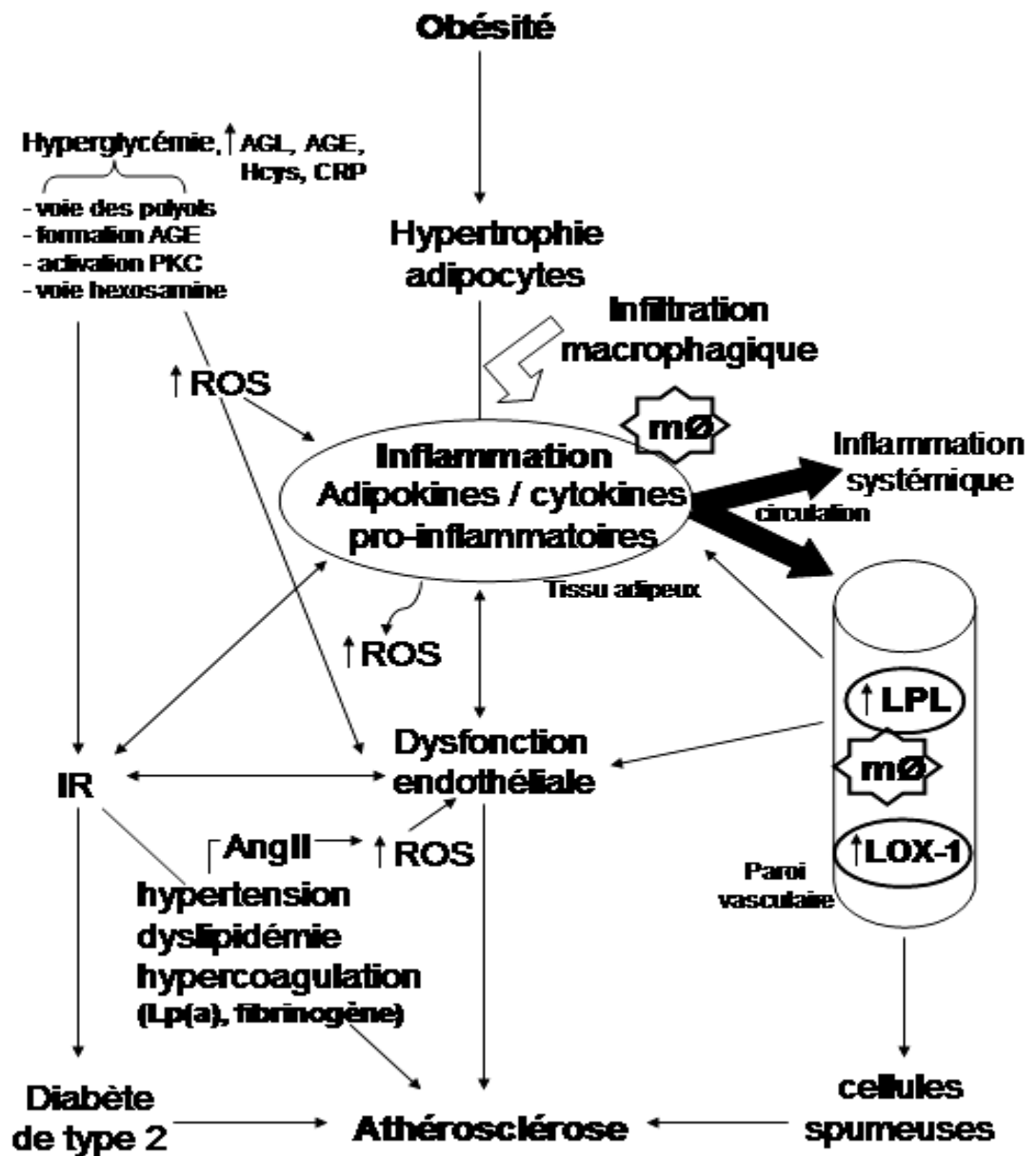


Figure 9. Résumé des interactions entre obésité, inflammation, IR et dysfonction endothéliale. Implication de la LPL macrophagique et de LOX-1 dans la vasculopathie diabétique qui en résulte.



Comme l'illustre cette dernière figure, l'hypothèse la plus reconnue actuellement est que l'obésité induit l'hypertrophie des adipocytes, ce qui déclenche l'influx de macrophages vers le tissu adipeux et leur activation. Cette infiltration macrophagique constitue la principale cause de l'état inflammatoire chronique de faible intensité associé à l'obésité. Cette réponse inflammatoire chronique se caractérise par la production accrue par les adipocytes infiltrés de cytokines pro-inflammatoires et d'adipokines, telles que la leptine, et par l'augmentation des taux circulants de marqueurs de l'inflammation, tels que la CRP. Certaines de ces molécules pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, peuvent, via la veine porte, atteindre le foie et augmenter la production de CRP, résultant en une réponse inflammatoire systémique. Ces molécules pro-inflammatoires peuvent également emprunter la circulation sanguine et aller directement agir, entre autres, au niveau des cellules de la paroi vasculaire, tels que les cellules endothéliales et les macrophages. En augmentant notamment l'expression de molécules d'adhésion et en favorisant le chémotactisme, ces cytokines peuvent augmenter l'adhésion des monocytes à l'endothélium, leur migration dans l'intima et la transformation des macrophages en cellules spumeuses, qui peuvent à leur tour perpétuer ainsi l'état d'inflammation. L'augmentation d'expression de la LPL macrophagique peut non seulement entretenir l'inflammation mais également promouvoir la formation de cellules spumeuses et la dysfonction endothéliale, deux étapes clés du processus athéromateux qui se produisent de manière accélérée dans le diabète de type 2 et auxquels peut également contribuer LOX-1, comme nous l'avons démontré.

Ajoutons par ailleurs, que l'état inflammatoire qui caractérise l'obésité joue un rôle clé dans la dysfonction endothéliale, notamment via la CRP qui en augmentant le stress oxydatif, en diminuant l'expression d'eNOS et en augmentant l'expression de diverses molécules d'adhésion vasoconstrictrices, peut induire la dysfonction endothéliale. Inversement, l'endothélium joue un rôle important dans l'inflammation, en exprimant diverses molécules d'adhésion permettant l'adhésion des monocytes à l'endothélium et leur migration dans la paroi vasculaire. De plus, comme nous l'avons vu, l'inflammation peut contribuer à l'IR via l'altération par certaines cytokines pro-inflammatoires, telles le  $TNF\alpha$  et l'IL-6, de la signalisation de l'insuline. Inversement, l'IR peut contribuer à l'inflammation car la signalisation de l'insuline étant altérée dans l'obésité, cette hormone ne peut exercer ses actions anti-inflammatoires, actions médiées via la diminution, entre autres, de l'expression d'ICAM-1, de NF-kB et de MCP-1. Plusieurs molécules dysrégulés dans le diabète, tels le glucose, les AGL et la CRP contribuent à l'IR et peuvent, par l'intermédiaire du stress oxydatif, induire l'inflammation et la dysfonction endothéliale. Par ailleurs, comme l'illustre cette dernière figure, les effets néfastes de l'IR sur la vasculopathie diabétique sont médiés non seulement par la dysfonction endothéliale mais également via l'état d'hypercoagulation, l'hypertension et la dyslipidémie engendrés par l'IR. Il semble donc que l'IR et la dysfonction endothéliale soient interreliées et que l'inflammation puisse agir en tant que lien mécanistique entre ces deux états, menant ultimement à la vasculopathie diabétique. Le diabète de type 2 et l'athérosclérose résulteraient donc d'un

antécédent commun, à savoir l'inflammation et l'augmentation d'expression de la LPL macrophagique et de LOX-1 par les facteurs inflammatoires que nous avons documentés, pourrait contribuer à expliquer l'incidence accrue de MCV observée chez les patients diabétiques de type 2.

## IV. Conclusion

Les résultats de nos études démontrent que :

- 1) LA augmente *in vitro* l'expression endothéliale de LOX-1
- 2) La CRP et la leptine induisent l'expression macrophagique de LPL.

L'ensemble de ces données suggère que : a) l'augmentation d'expression endothéliale de LOX-1 puisse constituer un nouveau mécanisme médiant les effets délétères de LA sur l'endothélium et que b) la CRP et la leptine puissent représenter deux nouveaux facteurs responsables de la surexpression de la LPL macrophagique observée dans le diabète de type 2.

## V. Perspectives

Les résultats de nos études, démontrant l'augmentation d'expression de LOX-1 et de la LPL macrophagique par des facteurs métaboliques altérés dans le diabète, viennent corroborer les résultats d'études antérieures effectuées dans notre laboratoire démontrant l'implication de ces deux molécules dans le développement de la vasculopathie diabétique. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques afin de diminuer ou idéalement neutraliser les effets vasculaires néfastes de ces deux molécules pro-athérogéniques.

L'amélioration du contrôle glycémique diminuant les concentrations de leptine (Ozata et al., 2001b) et de CRP (King, Mainous, III, Buchanan, & Pearson, 2003) constitue bien sûr l'une des premières interventions à considérer afin de diminuer les niveaux de LPL macrophagique. De plus, la perte pondérale, en diminuant les niveaux sériques d'AGL, pourrait diminuer l'IR musculaire et systémique et augmenter l'expression de la LPL musculaire et plasmatique (Hanyu et al., 2004; Ferreira et al., 2001). L'utilisation d'antioxydants, tels que la vitamine C et la vitamine E, pourrait également s'avérer profitable en diminuant les niveaux de stress oxydatif. Par contre, vu le manque d'évidences cliniques solides, les effets positifs d'une supplémentation en vitamines et en antioxydants demeurent controversés.

Dans l'élaboration d'une approche thérapeutique pour contrer les effets dommageables de la LPL dans la paroi vasculaire, il serait primordial de tenir compte de la dualité fonctionnelle de cette molécule. En effet, comme nous l'avons vu, la LPL exerce un rôle pro-athérogénique au niveau de la paroi vasculaire tandis qu'en périphérie, elle agit comme molécule anti-athérogénique. Cette particularité revêt un rôle d'autant plus important que dans le diabète de type 2, une diminution de l'activité de la LPL plasmatique et adipocytaire (Mead et al., 2002a) s'accompagne d'une augmentation de la LPL macrophagique (Sartippour et al., 2000). Dans cette optique, l'utilisation d'un agent activateur de la LPL plasmatique, adipocytaire ou musculaire pourrait être bénéfique. Le NO-1886 est un activateur synthétique de la LPL récemment développé, ayant la capacité d'augmenter les niveaux d'ARNm et l'activité de la LPL dans le tissu adipeux, le myocarde et le muscle squelettique, induisant de par ce fait une augmentation de l'activité et de la masse de la LPL plasmatique post-héparine (Yin & Tsutsumi, 2003). Bien qu'il n'ait pas encore été testé chez l'humain, les résultats d'études expérimentales laissent présager qu'il pourrait s'agir d'un agent anti-athérogénique très prometteur. En effet, son administration de façon prolongée à des rats et des lapins prévient le développement de lésions athéromateuses dans les artères coronariennes et dans l'aorte (Yin et al., 2003). Cet effet anti-athérogénique serait attribuable au fait qu'en augmentant l'activité de la LPL, le NO-1886 favorise la création d'un profil lipidique favorable caractérisé par la diminution des concentrations plasmatiques de TG et l'augmentation des concentrations de HDL. Plus récemment, il a été proposé que le NO-1886 puisse réduire la contractilité

vasculaire (Nakamura et al., 2007) et qu'il puisse diminuer l'expression de cytokines inflammatoires chez des porcs miniatures rendus diabétiques par une diète riche en graisse, en sucrose et en cholestérol (Cai et al., 2006). Ces données suggèrent que l'augmentation de la LPL plasmatique, adipocytaire ou musculaire puisse constituer une approche thérapeutique avantageuse dans le traitement de la vasculopathie diabétique.

En suivant le même raisonnement, la réduction des niveaux de LPL macrophagique ou de LOX-1 au niveau endothélial pourrait représenter un traitement thérapeutique également bénéfique dans le traitement de la vasculopathie diabétique. À cet effet, l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ciblant l'expression de la LPL ou du LOX-1 dans la paroi vasculaire pourrait s'avérer utile. LOX-1 et la LPL étant des molécules sensibles au stress oxydatif, l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans le stress oxydatif pourrait représenter une autre approche thérapeutique envisageable. Au vu de nos résultats et du rôle reconnu de la PKC dans la vasculopathie diabétique (Koya et al., 1998), l'utilisation d'inhibiteurs de la PKC pourrait s'avérer efficace dans la prévention et le traitement des MCV associées au diabète. A cet effet, il est utile de rappeler que la PKC existe sous différents isoformes et que l'inhibition de certains isoformes pourrait entraîner des effets toxiques indésirables (Campochiaro, 2004). Cet obstacle pourrait être contourné par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PKC $\beta$ , tel le RBX, ces isoformes étant activés de façon préférentielle dans le diabète (Beckman, Goldfine, Gordon, Garrett, &

Creager, 2002). Bien que l'utilisation du RBX s'avère un traitement efficace pour les complications microvasculaires du diabète de type 2 (Avignon & Sultan, 2006), jusqu'à maintenant, une seule étude a démontré un effet bénéfique de ce composé sur la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie chez l'humain. D'autres études sont donc nécessaires pour éclaircir son rôle dans la prévention et le traitement des complications macrovasculaires associées au diabète de type 2.

Nos résultats indiquant que LA pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale via l'augmentation d'expression de LOX-1 viennent étayer ceux de nombreuses autres études démontrant le rôle de LA dans l'activation de l'endothélium et la dysfonction endothéliale. Ceci revêt une importance particulière lorsqu'on sait que LA est un acide gras d'une importance majeure dans l'alimentation humaine, fournissant approximativement 7 à 8% de l'apport énergétique moyen (James, Gibson, & Cleland, 2000). Au cours des dernières années, notre hantise des effets néfastes des acides gras saturés et trans nous a poussé à augmenter notre apport en acides gras polyinsaturés, résultant en une consommation massive des huiles végétales les moins chères, telles que l'huile de soya et l'huile de maïs, des huiles riches en LA. Ces huiles, associées à une diète pauvre en antioxydants, s'avèrent aussi dommageables que les acides gras saturés ou trans. Au vu des effets bénéfiques des acides gras  $\omega 3$  et de l'OA sur l'endothélium, la consommation de ces acides gras semblent être une alternative beaucoup plus bénéfique pour la santé.



De nombreux autres nutriments tels que les polyphénols, l'acide folique, la L-arginine, la thiamine et les vitamines antioxydantes, semblent avoir des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire endothéliale en diminuant l'activation endothéliale ou en augmentant la vasodilatation de l'endothélium chez les sujets à risques de MCV et les sujets sains (Hamer & Steptoe, 2006). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les effets potentiellement bénéfiques sur la santé cardiovasculaire de ces nutriments et pour élucider leurs mécanismes d'action afin de pouvoir faire des recommandations nutritionnelles adéquates. Il demeure qu'une approche alimentaire globale et équilibrée, sous la forme d'une diète contenant des aliments variés, riche en fruits et légumes, pauvre en matières grasses et riche en fibres, demeure sans doute le meilleur choix pour jouir des effets bénéfiques de ces nutriments sur la santé cardiovasculaire. Finalement, de saines habitudes de vie, la pratique régulière d'une activité physique aérobique et une perte pondérale, s'il y a lieu, peuvent diminuer les concentrations plasmatiques de lipoprotéines post-prandiales, les résidus de lipoprotéines athérogènes ainsi que l'activation et la dysfonction endothéliale qui en résulte.

## VI. Bibliographie

Adler, A. I., Stratton, I. M., Neil, H. A., Yudkin, J. S., Matthews, D. R., Cull, C. A. et al. (2000). Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ*, 321, 412-419.

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., & White, M. F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J.Biol.Chem.*, 275, 9047-9054.

Ahima, R. S. (2005). Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol.Metab*, 16, 307-313.

Aiello, L. P., Clermont, A., Arora, V., Davis, M. D., Sheetz, M. J., & Bursell, S. E. (2006a). Inhibition of PKC beta by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 47, 86-92.

Aiello, L. P., Davis, M. D., Girach, A., Kles, K. A., Milton, R. C., Sheetz, M. J. et al. (2006b). Effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 113, 2221-2230.

Akagi, M., Kanata, S., Mori, S., Itabe, H., Sawamura, T., & Hamanishi, C. (2007). Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis. Cartilage.*, 15, 281-290.

Aleffi, S., Petrai, I., Bertolani, C., Parola, M., Colombatto, S., Novo, E. et al. (2005). Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 42, 1339-1348.

Ali, S., Stone, M. A., Peters, J. L., Davies, M. J., & Khunti, K. (2006). The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabet.Med.*, 23, 1165-1173.

Aljada, A., Ghanim, H., Saadeh, R., & Dandona, P. (2001). Insulin inhibits NFkappaB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 86, 450-453.

Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Abdo, T., Tripathy, D., Chaudhuri, A. et al. (2004). Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am.J.Clin.Nutr.*, 79, 682-690.

Aljada, A., Saadeh, R., Assian, E., Ghanim, H., & Dandona, P. (2000). Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 85, 2572-2575.

Altman, R., Rouvier, J., Scazzioti, A., & Gonzalez, C. (2002). No causal association between inflammation and Chlamydia pneumoniae in patients with chronic ischemic arterial disease. *Inflammation*, 26, 25-30.

Amri, E. Z., Teboul, L., Vannier, C., Grimaldi, P. A., & 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.

Anderson, R. J., Freedland, K. E., Clouse, R. E., & Lustman, P. J. (2001). The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 24, 1069-1078.

Anderson, T. J. (1999). Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 34, 631-638.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J. et al. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 49, 729-739.

Anuurad, E., Boffa, M. B., Koschinsky, M. L., & Berglund, L. (2006). Lipoprotein(a): a unique risk factor for cardiovascular disease. *Clin.Lab Med.*, 26, 751-772.

Aoyama, T., Chen, M., Fujiwara, H., Masaki, T., & Sawamura, T. (2000). LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 467, 217-220.

Aoyama, T., Sawamura, T., Furutani, Y., Matsuoka, R., Yoshida, M. C., Fujiwara, H. et al. (1999). Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. *Biochem.J.*, 339 ( Pt 1), 177-184.

Arad, Y., Spadaro, L. A., Goodman, K., Newstein, D., & Guerci, A. D. (2000). Prediction of coronary events with electron beam computed tomography. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 36, 1253-1260.

Argaves, K. M., Battey, F. D., MacCalman, C. D., McCrae, K. R., Gafvels, M., Kozarsky, K. F. et al. (1995). The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J.Biol.Chem.*, 270, 26550-26557.

Ashby, P., Bennett, D. P., Spencer, I. M., & Robinson, D. S. (1978). Post-translational regulation of lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *Biochem.J.*, *176*, 865-872.

Ashby, P. & Robinson, D. S. (1980). Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipids. *Biochem.J.*, *188*, 185-192.

Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B., & Mancini, M. (1999). Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *19*, 1819-1824.

Austin, M. A. (1998). Plasma triglyceride as a risk factor for cardiovascular disease. *Can.J.Cardiol.*, *14 Suppl B*, 14B-17B.

Auwerx, J. H., Deeb, S., Brunzell, J. D., Peng, R., & Chait, A. (1988). Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. *Biochemistry*, *27*, 2651-2655.

Avignon, A. & Sultan, A. (2006). PKC-B inhibition: a new therapeutic approach for diabetic complications? *Diabetes Metab*, 32, 205-213.

Aviram, M., Bierman, E. L., & 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.

Azuma, K., Katsukawa, F., Oguchi, S., Murata, M., Yamazaki, H., Shimada, A. et al. (2003). Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes.Res.*, 11, 997-1001.

Babaev, V. R., Fazio, S., Gleaves, L. A., Carter, K. J., Semenkovich, C. F., & 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., & 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.

Bae, J. H., Bassenge, E., Kim, K. B., Kim, Y. N., Kim, K. S., Lee, H. J. et al. (2001). Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis*, 155, 517-523.

Bagg, W., Ferri, C., Desideri, G., Gamble, G., Ockelford, P., & Braatvedt, G. D. (2001). The influences of obesity and glycemic control on endothelial activation in patients with type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 86, 5491-5497.

Balletshofer, B. M., Rittig, K., Enderle, M. D., Volk, A., Maerker, E., Jacob, S. et al. (2000). Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation*, 101, 1780-1784.

Ballou, S. P. & Lozanski, G. (1992). Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*, 4, 361-368.

Baltz, M. L., de Beer, F. C., Feinstein, A., Munn, E. A., Milstein, C. P., Fletcher, T. C. et al. (1982). Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 389, 49-75.

Barzilay, J. I., Abraham, L., Heckbert, S. R., Cushman, M., Kuller, L. H., Resnick, H. E. et al. (2001). The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*, 50, 2384-2389.

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



Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H. et al. (1996). The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 8374-8378.

Bautista, L. E., Arenas, I. A., Penuela, A., & Martinez, L. X. (2002). Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J.Clin.Epidemiol.*, 55, 882-887.

Baynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40, 405-412.

Beauchamp, M. C., Letendre, E., & Renier, G. (2002). Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J.Lipid Res.*, 43, 215-222.

Beauchamp, M. C., Michaud, S. E., Li, L., Sartippour, M. R., & Renier, G. (2004). Advanced glycation end products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression. *J.Lipid Res.*, 45, 1749-1757.

Beauchamp, M. C. & Renier, G. (2002). Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-Fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes*, 51, 1180-1187.

Beckman, J. A., Goldfine, A. B., Gordon, M. B., Garrett, L. A., & Creager, M. A. (2002). 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. & Kraemer, F. B. (1988). Insulin deficiency decreases lipoprotein lipase secretion by murine macrophages. *Diabetes*, *37*, 1076-1081.

Beisiegel, U. & Heeren, J. (1997). Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc.Nutr.Soc.*, *56*, 731-737.

Beltowski, J. (2006). Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *189*, 47-60.

Beltowski, J., Jamroz-Wisniewska, A., Borkowska, E., & Wojcicka, G. (2005). Differential effect of antioxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats. *Pharmacol.Res.*, *51*, 523-532.

Beltowski, J., Wojcicka, G., & Jamroz, A. (2003). Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel

mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis*, 170, 21-29.

Beltowski, J., Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Borkowska, E., & Marciniak, A. (2005). Antioxidant treatment normalizes nitric oxide production, renal sodium handling and blood pressure in experimental hyperleptinemia. *Life Sci.*, 77, 1855-1868.

Beltowski, J., Wojcicka, G., Marciniak, A., & Jamroz, A. (2004). Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. *Life Sci.*, 74, 2987-3000.

Bengtsson, G. & Olivecrona, T. (1982). Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein CII. Demonstration of an effect of the activator on the binding of the enzyme to milk-fat globules. *FEBS Lett.*, 147, 183-187.

Benlian, P., De Gennes, J. L., Foubert, L., Zhang, H., Gagne, S. E., & Hayden, M. (1996). Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N.Engl.J.Med.*, 335, 848-854.

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

Bergman, R. N., Kim, S. P., Hsu, I. R., Catalano, K. J., Chiu, J. D., Kabir, M. et al. (2007). Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am.J.Med.*, 120, S3-S8.

Bergo, M., Olivecrona, G., & Olivecrona, T. (1996). Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem.J.*, 313 ( Pt 3), 893-898.

Berryman, D. E. & Bensadoun, A. (1993). Site-directed mutagenesis of a putative heparin binding domain of avian lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.*, 268, 3272-3276.

Bhagat, K. & Vallance, P. (1997). Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*, 96, 3042-3047.

Bharadwaj, D., Stein, M. P., Volzer, M., Mold, C., & Du Clos, T. W. (1999). The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J.Exp.Med.*, 190, 585-590.

Biondi-Zoccai, G. G., Abbate, A., Liuzzo, G., & Biasucci, L. M. (2003). Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 41, 1071-1077.

Bjorntorp, P. (1990). "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis*, 10, 493-496.

Blake, G. J. & Ridker, P. M. (2001). Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ.Res.*, 89, 763-771.

Blankenberg, S., Barbaux, S., & Tiret, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170, 191-203.

Blankenhorn, D. H., Johnson, R. L., Mack, W. J., el Zein, H. A., & Vailas, L. I. (1990). The influence of diet on the appearance of new lesions in human coronary arteries. *JAMA*, 263, 1646-1652.

Blann, A. & Seigneur, M. (1997). Soluble markers of endothelial cell function. *Clin.Hemorheol.Microcirc.*, 17, 3-11.

Blow, D. (1990). Enzymology. More of the catalytic triad. *Nature*, 343, 694-695.

Bodary, P. F., Gu, S., Shen, Y., Hasty, A. H., Buckler, J. M., & Eitzman, D. T. (2005). Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, e119-e122.

Boden, G. (2005). Free fatty acids and insulin secretion in humans. *Curr.Diab.Rep.*, 5, 167-170.

Bonaa, K. H., Njolstad, I., Ueland, P. M., Schirmer, H., Tverdal, A., Steigen, T. et al. (2006). Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N.Engl.J.Med.*, 354, 1578-1588.

Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, 168-175.

Boren, J., Lookene, A., Makoveichuk, E., Xiang, S., Gustafsson, M., Liu, H. et al. (2001). Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. *J.Biol.Chem.*, 276, 26916-26922.

Bouhanick, B., Berrut, G., Fabbri, P., Fressinaud, P., & Marre, M. (1996). [Nephropathy in non-insulin-dependent diabetics]. *Presse Med.*, 25, 1251-1256.

Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M., & Busse, R. (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.*, 13, 1231-1238.

Boyko, E. J., Fujimoto, W. Y., Leonetti, D. L., & Newell-Morris, L. (2000). Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*, 23, 465-471.

Braun, J. E. & Severson, D. L. (1992a). Lipoprotein lipase release from cardiac myocytes is increased by decavanadate but not insulin. *Am.J.Physiol*, 262, E663-E670.

Braun, J. E. & Severson, D. L. (1992b). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem.J.*, 287 ( Pt 2), 337-347.

Browatzki, M., Schmidt, J., Kubler, W., & Kranzhofer, R. (2000). Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res.Cardiol.*, 95, 98-105.

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-1625.

Brunner, H., Cockcroft, J. R., Deanfield, J., Donald, A., Ferrannini, E., Halcox, J. et al. (2005). Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J.Hypertens.*, 23, 233-246.

Bullo, M., Garcia-Lorda, P., Peinado-Onsurbe, J., Hernandez, M., Del, C. D., Argiles, J. M. et al. (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.

Cabrero, A., Cubero, M., Llaverias, G., Alegret, M., Sanchez, R., Laguna, J. C. et al. (2005). Leptin down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) mRNA levels in primary human monocyte-derived macrophages. *Mol.Cell Biochem.*, 275, 173-179.

Cai, M., Yin, W., Li, Q., Liao, D., Tsutsumi, K., Hou, H. et al. (2006). Effects of NO-1886 on inflammation-associated cytokines in high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet-fed miniature pigs. *Eur.J.Pharmacol.*, 540, 139-146.

Calabro, P., Willerson, J. T., & Yeh, E. T. (2003). Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*, 108, 1930-1932.

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



Campochiaro, P. A. (2004). Reduction of diabetic macular edema by oral administration of the kinase inhibitor PKC412. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45, 922-931.

Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaro, S., & Olivecrona, T. (1990). Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am.J.Physiol*, 258, C673-C681.

Canavan, B., Salem, R. O., Schurgin, S., Koutkia, P., Lipinska, I., Laposata, M. et al. (2005). Effects of physiological leptin administration on markers of inflammation, platelet activation, and platelet aggregation during caloric deprivation. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 90, 5779-5785.

Cantin, B., Despres, J. P., Lamarche, B., Moorjani, S., Lupien, P. J., Bogaty, P. et al. (2002). Association of fibrinogen and lipoprotein(a) as a coronary heart disease risk factor in men (The Quebec Cardiovascular Study). *Am.J.Cardiol.*, 89, 662-666.

Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G. et al. (2006). Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 55, 2688-2697.

Carlsson, S., Hammar, N., & Grill, V. (2005). Alcohol consumption and type 2 diabetes Meta-analysis of epidemiological studies indicates a U-shaped relationship. *Diabetologia*, 48, 1051-1054.

Carluccio, M. A., Massaro, M., Bonfrate, C., Siculella, L., Maffia, M., Nicolardi, G. et al. (1999). Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 220-228.

Carneheim, C., Nedergaard, J., & Cannon, B. (1984). Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *Am.J.Physiol*, 246, E327-E333.

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.

Cavusoglu, E., Ruwende, C., Eng, C., Chopra, V., Yanamadala, S., Clark, L. T. et al. (2007). Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am.J.Cardiol.*, 99, 1364-1368.

Ceddia, R. B., Koistinen, H. A., Zierath, J. R., & Sweeney, G. (2002). Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.*, 16, 1163-1176.

Ceriello, A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*, *54*, 1-7.

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

Chan, B. L., Lisanti, M. P., Rodriguez-Boulan, E., & Saltiel, A. R. (1988). Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science*, *241*, 1670-1672.

Chang, J. W., Kim, C. S., Kim, S. B., Park, S. K., Park, J. S., & Lee, S. K. (2005). C-reactive protein induces NF-kappaB activation through intracellular calcium and ROS in human mesangial cells. *Nephron Exp.Nephrol.*, *101*, e165-e172.

Chappell, D. A., Fry, G. L., Waknitz, M. A., & Berns, J. J. (1992). Evidence for isomerization during binding of apolipoprotein-B100 to low density lipoprotein receptors. *J.Biol.Chem.*, *267*, 270-279.

Chappell, D. A., Fry, G. L., Waknitz, M. A., Muhonen, L. E., Pladet, M. W., Iverius, P. H. et al. (1993). Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-

macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans.

*J.Biol.Chem.*, 268, 14168-14175.

Chappell, D. A. & Medh, J. D. (1998). Receptor-mediated mechanisms of

lipoprotein remnant catabolism. *Prog.Lipid Res.*, 37, 393-422.

Chavez, J. A., Knotts, T. A., Wang, L. P., Li, G., Dobrowsky, R. T., Florant, G. L. et

al. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin

signal transduction by saturated fatty acids. *J.Biol.Chem.*, 278, 10297-10303.

Chen, H., Li, D., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2001). Transforming growth factor-

beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion

molecules: role of LOX-1. *Circ.Res.*, 89, 1155-1160.

Chen, K., Li, F., Li, J., Cai, H., Strom, S., Bisello, A. et al. (2006a). Induction of

leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin.

*Nat.Med.*, 12, 425-432.

Chen, M., Kakutani, M., Minami, M., Kataoka, H., Kume, N., Narumiya, S. et al.

(2000). Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein

receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic

rabbits. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20, 1107-1115.

Chen, M., Masaki, T., & Sawamura, T. (2002). LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.*, *95*, 89-100.

Chen, M., Nagase, M., Fujita, T., Narumiya, S., Masaki, T., & Sawamura, T. (2001). Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *287*, 962-968.

Chen, M., Narumiya, S., Masaki, T., & Sawamura, T. (2001). Conserved C-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized low-density-lipoprotein binding. *Biochem. J.*, *355*, 289-296.

Chen, M. P., Chung, F. M., Chang, D. M., Tsai, J. C., Huang, H. F., Shin, S. J. et al. (2006b). Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *91*, 295-299.

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

Cheng, Q., Blackett, P., Jackson, K. W., McConathy, W. J., & Wang, C. S. (1990). C-terminal domain of apolipoprotein CII as both activator and competitive inhibitor of lipoprotein lipase. *Biochem.J.*, 269, 403-407.

Chernick, S. S., Spooner, P. M., Garrison, M. M., & Scow, R. O. (1986). Effect of epinephrine and other lipolytic agents on intracellular lipolysis and lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J.Lipid Res.*, 27, 286-294.

Chiba, T., Shinozaki, S., Nakazawa, T., Kawakami, A., Ai, M., Kaneko, E. et al. (2007). Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*.

Chiba, Y., Ogita, T., Ando, K., & Fujita, T. (2001). PPARgamma ligands inhibit TNF-alpha-induced LOX-1 expression in cultured endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 286, 541-546.

Chu, N. F., Spiegelman, D., Hotamisligil, G. S., Rifai, N., Stampfer, M., & Rimm, E. B. (2001). Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis*, 157, 495-503.

Chui, P. C., Guan, H. P., Lehrke, M., & Lazar, M. A. (2005). PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J.Clin.Invest*, 115, 2244-2256.

Ciccione, M., Vettor, R., Pannacciulli, N., Minenna, A., Bellacicco, M., Rizzon, P. et al. (2001). Plasma leptin is independently associated with the intima-media thickness of the common carotid artery. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, 25, 805-810.

Cilingiroglu, M. & Ozer, K. (2005). The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor and its role in atherosclerosis. *Curr.Atheroscler.Rep.*, 7, 103-107.

Cipollone, F., Iezzi, A., Fazio, M., Zucchelli, M., Pini, B., Cucurullo, C. et al. (2003). The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation*, 108, 1070-1077.

Clee, S. M., Bissada, N., Miao, F., Miao, L., Marais, A. D., Henderson, H. E. et al. (2000). Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J.Lipid Res.*, 41, 521-531.

Cleland, S. J., Sattar, N., Petrie, J. R., Forouhi, N. G., Elliott, H. L., & Connell, J. M. (2000). Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin.Sci.(Lond)*, *98*, 531-535.

Colberg, S. R., Hagberg, J. M., McCole, S. D., Zmuda, J. M., Thompson, P. D., & Kelley, D. E. (1996). Utilization of glycogen but not plasma glucose is reduced in individuals with NIDDM during mild-intensity exercise. *J.Appl.Physiol*, *81*, 2027-2033.

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

Collie-Duguid, E. S. & Wahle, K. W. (1996). Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, *220*, 969-974.

Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., & Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.*, *9*, 899-909.

Colwell, J. A. (2001). Treatment for the procoagulant state in type 2 diabetes. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.*, *30*, 1011-1030.



Cominacini, L., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M. et al. (2000). Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.*, 275, 12633-12638.

Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M. et al. (2001). The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J.Biol.Chem.*, 276, 13750-13755.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R. et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N.Engl.J.Med.*, 334, 292-295.

Constans, J. & Conri, C. (2006). Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin.Chim.Acta*, 368, 33-47.

Coppack, S. W., Yost, T. J., Fisher, R. M., Eckel, R. H., & Miles, J. M. (1996). Periprandial systemic and regional lipase activity in normal humans. *Am.J.Physiol*, 270, E718-E722.

Corsonello, A., Malara, A., Ientile, R., & Corica, F. (2002). Leptin enhances adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in healthy subjects. *Obes.Res.*, *10*, 306.

Crea, F., Monaco, C., Lanza, G. A., Maggi, E., Ginnetti, F., Cianflone, D. et al. (2002). Inflammatory predictors of mortality in the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Clin.Cardiol.*, *25*, 461-466.

Cryer, A. (1981). Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int.J.Biochem.*, *13*, 525-541.

Curb, J. D., Abbott, R. D., Rodriguez, B. L., Sakkinen, P., Popper, J. S., Yano, K. et al. (2003). C-reactive protein and the future risk of thromboembolic stroke in healthy men. *Circulation*, *107*, 2016-2020.

Cury-Boaventura, M. F. & Curi, R. (2005). Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by C18 fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clin.Sci.(Lond)*, *108*, 245-253.

Cushman, M., Arnold, A. M., Psaty, B. M., Manolio, T. A., Kuller, L. H., Burke, G. L. et al. (2005). C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study. *Circulation*, *112*, 25-31.

Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., Pratipanawatr, T. et al. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J.Clin.Invest*, *105*, 311-320.

Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.*, *25*, 4-7.

Dandona, P., Aljada, A., & Mohanty, P. (2002). The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. *Diabetologia*, *45*, 924-930.

Dandona, P., Mohanty, P., Ghanim, H., Aljada, A., Browne, R., Hamouda, W. et al. (2001). The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, *86*, 355-362.

Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., bdel-Rahman, E., Aljada, A., & Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, *83*, 2907-2910.

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

Danesh, J., Wheeler, J. G., Hirschfield, G. M., Eda, S., Eiriksdottir, G., Rumley, A. et al. (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.*, *350*, 1387-1397.

Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P. et al. (2000). Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ*, *321*, 199-204.

Das, E. N. & King, G. L. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol.Res.*, *55*, 498-510.

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

Davis, M. D., Sheetz, M. J., Aiello, L. P., Milton, R. C., Danis, R. P., et al. (2008). Ruboxistaurin May Ameliorate the Visual Acuity Decrease Associated with Long-standing Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* Epub ahead of print

de, A. C., Teruel, T., Hernandez, R., & Lorenzo, M. (2004). Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor

kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J.Biol.Chem.*, 279, 17070-17078.

De, B. A., Verschuren, W. M., Kromhout, D., Kluijtmans, L. A., & Blom, H. J. (2002). Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol.Rev.*, 54, 599-618.

De, C. R., Liao, J. K., & Libby, P. (2000). Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am.J.Clin.Nutr.*, 71, 213S-223S.

De, M., V, De, P. G., Vettor, R., Marino, R., Sciaraffia, M., Pagano, C. et al. (1999). Plasma plasminogen activator inhibitor-I is associated with plasma leptin irrespective of body mass index, body fat mass, and plasma insulin and metabolic parameters in premenopausal women. *Metabolism*, 48, 960-964.

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

De, V. P., Lefebvre, A. M., Miller, S. G., Guerre-Millo, M., Wong, K., Saladin, R. et al. (1996). Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J.Clin.Invest*, 98, 1004-1009.

DeFronzo, R. A. (1992). Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia*, *35*, 389-397.

Denning, G. M., Figard, P. H., Kaduce, T. L., & Spector, A. A. (1983). Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. *J.Lipid Res.*, *24*, 993-1001.

Dent, P., Jarvis, W. D., Birrer, M. J., Fisher, P. B., Schmidt-Ullrich, R. K., & Grant, S. (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.

Desfaits, A. C., Serri, O., & Renier, G. (1998). Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor-alpha production in NIDDM patients after gliclazide treatment. *Diabetes Care*, *21*, 487-493.

Deshaiies, Y., Geloen, A., Paulin, A., & Bukowiecki, L. J. (1991). Restoration of lipoprotein lipase activity in insulin-deficient rats by insulin infusion is tissue-specific. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, *69*, 746-751.

Despres, J. P. (2006b). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann.Med.*, *38*, 52-63.

Despres, J. P. (2006a). Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J.Endocrinol.Invest*, 29, 77-82.

Devaraj, S., Venugopal, S. K., Singh, U., & Jialal, I. (2005). Hyperglycemia induces monocyte release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- $\alpha$  and - $\beta$ . *Diabetes*, 54, 85-91.

Devaraj, S., Xu, D. Y., & 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.

Dhindsa, S., Tripathy, D., Mohanty, P., Ghanim, H., Syed, T., Aljada, A. et al. (2004). Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells. *Metabolism*, 53, 330-334.

Dichtl, W., Ares, M. P., Jonson, A. N., Jovinge, S., Pachinger, O., Giachelli, C. M. et al. (2002). Linoleic acid-stimulated vascular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells depends on nuclear factor-kappaB activation. *Metabolism*, 51, 327-333.

Dichtl, W., Stiko, A., Eriksson, P., Goncalves, I., Calara, F., Banfi, C. et al. (1999). Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator

inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells.

*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 3025-3032.

Diehl, E. E., Haines, G. K., III, Radosevich, J. A., & Potempa, L. A. (2000).

Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am.J.Med.Sci.*, 319, 79-83.

Dobrian, A. D., Lazar, V., Sinescu, C., Mincu, D., & 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., & Deeb, S. S. (1991). Transcriptional activation of the lipoprotein lipase gene in macrophages by dexamethasone. *Biochemistry*, 30, 2570-2574.

Dong, F., Zhang, X., & Ren, J. (2006). Leptin regulates cardiomyocyte contractile function through endothelin-1 receptor-NADPH oxidase pathway. *Hypertension*, 47, 222-229.

Doolittle, M. H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D., & Kirchgessner, T. G. (1990). The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J.Biol.Chem.*, 265, 4570-4577.



Draude, G., Hrboticky, N., & Lorenz, R. L. (1999). The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin.

*Biochem.Pharmacol.*, 57, 383-386.

Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J.Biol.Chem.*, 263, 9557-9560.

Dugi, K. A., Feuerstein, I. M., Hill, S., Shih, J., Santamarina-Fojo, S., Brewer, H. B., Jr. et al. (1997). Lipoprotein lipase correlates positively and hepatic lipase inversely with calcific atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia.

*Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 17, 354-364.

Dunn, E. J. & Grant, P. J. (2005). Type 2 diabetes: an atherothrombotic syndrome.

*Curr.Mol.Med.*, 5, 323-332.

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

Eckel, R. H. & 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.

Eckel, R. H. & Yost, T. J. (1987). Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J.Clin.Invest*, 80, 992-997.

Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M. et al. (2001). Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 103, 1955-1960.

Ehlers, M. R. & Riordan, J. F. (1991). Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry*, 30, 10065-10074.

Elbein, S. C. (1997). The genetics of human noninsulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *J.Nutr.*, 127, 1891S-1896S.

Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D. J. et al. (2001). SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J.Biol.Chem.*, 276, 47944-47949.

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

Erdmann, E. & Wilcox, R. G. (2008). Weighing up the cardiovascular benefits of thiazolidinedione therapy: the impact of increased risk of heart failure. *Eur.Heart J.*, 29, 12-20.

Evans, A. J., Sawyez, C. G., Wolfe, B. M., Connelly, P. W., Maguire, G. F., & 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.

Fernandez-Real, J. M., Broch, M., Vendrell, J., Gutierrez, C., Casamitjana, R., Pugeat, M. et al. (2000). Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 49, 517-520.

Ferrannini, E. & Iozzo, P. (2006). Is insulin resistance atherogenic? A review of the evidence. *Atheroscler.Suppl*, 7, 5-10.

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

Ferraro, R. T., Eckel, R. H., Larson, D. E., Fontvieille, A. M., Rising, R., Jensen, D. R. et al. (1993). Relationship between skeletal muscle lipoprotein lipase activity and 24-hour macronutrient oxidation. *J.Clin.Invest*, 92, 441-445.

Ferreira, L. D., Pulawa, L. K., Jensen, D. R., & Eckel, R. H. (2001). Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes*, *50*, 1064-1068.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C., Savino, S., Liuzzi, A., Balzola, F. et al. (2005). Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, *90*, 1728-1733.

Ferrucci, L., Cavazzini, C., Corsi, A., Bartali, B., Russo, C. R., Lauretani, F. et al. (2002). Biomarkers of frailty in older persons. *J.Endocrinol.Invest*, *25*, 10-15.

Festa, A., D'Agostino, R., Jr., Tracy, R. P., & Haffner, S. M. (2002). Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, *51*, 1131-1137.

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

Fischer, S., Hanefeld, M., Haffner, S. M., Fusch, C., Schwanebeck, U., Kohler, C. et al. (2002). Insulin-resistant patients with type 2 diabetes mellitus have higher serum leptin levels independently of body fat mass. *Acta Diabetol.*, *39*, 105-110.

Fisher, R. M., Humphries, S. E., & Talmud, P. J. (1997). Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis.

*Atherosclerosis*, 135, 145-159.

Folsom, A. R., Rosamond, W. D., Shahar, E., Cooper, L. S., Aleksic, N., Nieto, F. J. et al. (1999). Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation*, 100, 736-742.

Foody, J. M., Milberg, J. A., Robinson, K., Pearce, G. L., Jacobsen, D. W., & Sprecher, D. L. (2000). Homocysteine and lipoprotein(a) interact to increase CAD risk in young men and women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 493-499.

Fowkes, F. G. (1995). Fibrinogen and cardiovascular disease in clinical practice. *Eur. Heart J.*, 16 Suppl A, 60-63.

Franks, P. W., Brage, S., Luan, J., Ekelund, U., Rahman, M., Farooqi, I. S. et al. (2005). Leptin predicts a worsening of the features of the metabolic syndrome independently of obesity. *Obes. Res.*, 13, 1476-1484.

Freeman, D. J., Norrie, J., Caslake, M. J., Gaw, A., Ford, I., Lowe, G. D. et al. (2002). C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development

of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes*, 51, 1596-1600.

Freitas, J. P., Filipe, P. M., & Rodrigo, F. G. (1997). Lipid peroxidation in type 2 normolipidemic diabetic patients. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 36, 71-75.

Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 83, 847-850.

Friedman, G., Chajek-Shaul, T., Stein, O., Noe, L., Etienne, J., & Stein, Y. (1986). Beta-adrenergic stimulation enhances translocation, processing and synthesis of lipoprotein lipase in rat heart cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 877, 112-120.

Friedrichs, B., Toborek, M., Hennig, B., Heinevetter, L., Muller, C., & Brigelius-Flohe, R. (1999). 13-HPODE and 13-HODE modulate cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules differently. *Biofactors*, 9, 61-72.

Fu, T. & Borensztajn, J. (2002). Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem.J.*, 366, 195-201.

Fujii, H., Li, S. H., Szmitko, P. E., Fedak, P. W., & Verma, S. (2006). C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 2476-2482.

Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K. et al. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307, 426-430.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., & Chesebro, J. H. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N.Engl.J.Med.*, 326, 242-250.

Gardner, G., Banka, C. L., Roberts, K. A., Mullick, A. E., & Rutledge, J. C. (1999). Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 854-861.

Gaw, A., Boerwinkle, E., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (1994). Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. Evidence for no common "null" allele at the apo(a) locus. *J.Clin.Invest*, 93, 2526-2534.

Genot, E. M., Parker, P. J., & Cantrell, D. A. (1995). Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation. *J.Biol.Chem.*, 270, 9833-9839.

Gerich, J. E. (2006). Postprandial hyperglycemia and cardiovascular disease. *Endocr.Pract.*, 12 Suppl 1, 47-51.

Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T., Mohanty, P., & Dandona, P. (2004). Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, 110, 1564-1571.

Giacca, A., Groenewoud, Y., Tsui, E., McClean, P., & Zinman, B. (1998). Glucose production, utilization, and cycling in response to moderate exercise in obese subjects with type 2 diabetes and mild hyperglycemia. *Diabetes*, 47, 1763-1770.

Giandomenico, G., Dellas, C., Czekay, R. P., Koschnick, S., & Loskutoff, D. J. (2005). The leptin receptor system of human platelets. *J.Thromb.Haemost.*, 3, 1042-1049.

Gillum, R. F. (1997). Sudden cardiac death in Hispanic Americans and African Americans. *Am.J.Public Health*, 87, 1461-1466.



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

Goldberg, I. J. & Merkel, M. (2001). Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci.*, 6, D388-D405.

Goldschmid, M. G., Barrett-Connor, E., Edelstein, S. L., Wingard, D. L., Cohn, B. A., & Herman, W. H. (1994). Dyslipidemia and ischemic heart disease mortality among men and women with diabetes. *Circulation*, 89, 991-997.

Gomez-Valades, A. G., Vidal-Alabro, A., Molas, M., Boada, J., Bermudez, J., Bartrons, R. et al. (2006). Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol.Ther.*, 13, 401-410.

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

Goon, P. K., Boos, C. J., & Lip, G. Y. (2005). Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. *Clin.Lab*, 51, 531-538.

Grad, E., Golomb, M., Mor-Yosef, I., Koroukhov, N., Lotan, C., Edelman, E. R. et al. (2007). Transgenic expression of human C-reactive protein suppresses endothelial nitric oxide synthase expression and bioactivity after vascular injury. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 293, H489-H495.

Groop, L. C., Saloranta, C., Shank, M., Bonadonna, R. C., Ferrannini, E., & DeFronzo, R. A. (1991). The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 72, 96-107.

Grundy, S. M. (2004). Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 89, 2595-2600.

Grundy, S. M., Garber, A., Goldberg, R., Havas, S., Holman, R., Lamendola, C. et al. (2002). Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group IV: lifestyle and medical management of risk factors. *Circulation*, 105, e153-e158.

Gu, K., Cowie, C. C., & 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.

- Haidara, M. A., Yassin, H. Z., Rateb, M., Ammar, H., & Zorkani, M. A. (2006). Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr.Vasc.Pharmacol.*, 4, 215-227.
- Halcox, J. P., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M. A. et al. (2002). Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*, 106, 653-658.
- Halvorsen, B., Staff, A. C., Henriksen, T., Sawamura, T., & Ranheim, T. (2001). 8-iso-prostaglandin F(2alpha) increases expression of LOX-1 in JAR cells. *Hypertension*, 37, 1184-1190.
- Hamer, M. & Steptoe, A. (2006). Influence of specific nutrients on progression of atherosclerosis, vascular function, haemostasis and inflammation in coronary heart disease patients: a systematic review. *Br.J.Nutr.*, 95, 849-859.
- Hamosh, M., Yeager, M., Jr., Shechter, Y., & Hamosh, P. (1976). Lipoprotein lipase in rat lung. Effect of dexamethasone. *Biochim.Biophys.Acta*, 431, 519-525.
- Han, J., Hajjar, D. P., Febbraio, M., & Nicholson, A. C. (1997). Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J.Biol.Chem.*, 272, 21654-21659.

Han, K. H., Hong, K. H., Park, J. H., Ko, J., Kang, D. H., Choi, K. J. et al. (2004). C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1--mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. *Circulation*, 109, 2566-2571.

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

Hanyu, O., Miida, T., Obayashi, K., Ikarashi, T., Soda, S., Kaneko, S. et al. (2004). Lipoprotein lipase (LPL) mass in preheparin serum reflects insulin sensitivity. *Atherosclerosis*, 174, 385-390.

Harding, A. H., Day, N. E., Khaw, K. T., Bingham, S., Luben, R., Welsh, A. et al. (2004). Dietary fat and the risk of clinical type 2 diabetes: the European prospective investigation of Cancer-Norfolk study. *Am.J.Epidemiol.*, 159, 73-82.

Harris, M. I. (1998). Diabetes in America: epidemiology and scope of the problem. *Diabetes Care*, 21 Suppl 3, C11-C14.

Harris, M. I., Eastman, R. C., Cowie, C. C., Flegal, K. M., & Eberhardt, M. S. (1999). Racial and ethnic differences in glycemic control of adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 22, 403-408.

Harrison, G. J., Jordan, L. R., Selley, M. L., & Willis, R. J. (1995). Low-density lipoproteins inhibit histamine and NaNO<sub>2</sub> relaxations of the coronary vasculature and reduce contractile function in isolated rat hearts. *Heart Vessels*, *10*, 249-257.

Hasegawa, G., Ohta, M., Ichida, Y., Obayashi, H., Shigeta, M., Yamasaki, M. et al. (2005). Increased serum resistin levels in patients with type 2 diabetes are not linked with markers of insulin resistance and adiposity. *Acta Diabetol.*, *42*, 104-109.

Hasty, A. H., Shimano, H., Osuga, J., Namatame, I., Takahashi, A., Yahagi, N. et al. (2001). Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem.*, *276*, 37402-37408.

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

Hayashida, K., Kume, N., Minami, M., & Kita, T. (2002). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) supports adhesion of mononuclear leukocytes and a monocyte-like cell line THP-1 cells under static and flow conditions. *FEBS Lett.*, *511*, 133-138.

Hayashida, K., Kume, N., Murase, T., Minami, M., Nakagawa, D., Inada, T. et al. (2005). Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome: a novel marker for early diagnosis. *Circulation*, *112*, 812-818.

Heidemann, C., Hoffmann, K., Spranger, J., Klipstein-Grobusch, K., Mohlig, M., Pfeiffer, A. F. et al. (2005). A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)--Potsdam Study cohort. *Diabetologia*, *48*, 1126-1134.

Heitzer, T., Yla-Herttuala, S., Luoma, J., Kurz, S., Munzel, T., Just, H. et al. (1996). Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation*, *93*, 1346-1353.

Hemon, P., Ricquier, D., & Mory, G. (1975). The lipoprotein lipase activity of brown adipose tissue during early post-natal development of the normal and hypothyroid rat. *Horm.Metab Res.*, *7*, 481-484.

Henderson, H. E., Kastelein, J. J., Zwinderman, A. H., Gagne, E., Jukema, J. W., Reymer, P. W. et al. (1999). Lipoprotein lipase activity is decreased in a large cohort of patients with coronary artery disease and is associated with changes in lipids and lipoproteins. *J.Lipid Res.*, *40*, 735-743.

Henderson, H. E., Ma, Y., Liu, M. S., Clark-Lewis, I., Maeder, D. L., Kastelein, J. J. et al. (1993). Structure-function relationships of lipoprotein lipase: mutation analysis and mutagenesis of the loop region. *J.Lipid Res.*, *34*, 1593-1602.

Hennekens, C. H. (1997). Antioxidant vitamins and cardiovascular disease: current perspectives and future directions. *Eur.Heart J.*, *18*, 177-179.

Hennig, B., Boissonneault, G. A., Chow, C. K., Wang, Y., Matulionis, D. H., & Glauert, H. P. (1990). Effect of vitamin E on linoleic acid-mediated induction of peroxisomal enzymes in cultured porcine endothelial cells. *J.Nutr.*, *120*, 331-337.

Hennig, B., Lei, W., Arzuaga, X., Ghosh, D. D., Saraswathi, V., & Toborek, M. (2006). Linoleic acid induces proinflammatory events in vascular endothelial cells via activation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling. *J.Nutr.Biochem.*, *17*, 766-772.

Hennig, B., Meerarani, P., Ramadass, P., Watkins, B. A., & Toborek, M. (2000). Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism*, *49*, 1006-1013.

Hennig, B., Toborek, M., Joshi-Barve, S., Barger, S. W., Barve, S., Mattson, M. P. et al. (1996). Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am.J.Clin.Nutr.*, 63, 322-328.

Hennig, B., Toborek, M., & McClain, C. J. (2001). High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J.Am.Coll.Nutr.*, 20, 97-105.

Herder, C., Baumert, J., Thorand, B., Koenig, W., de, J. W., Meisinger, C. et al. (2006). Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002. *Diabetologia*, 49, 921-929.

Hergenc, G., Schulte, H., Assmann, G., & von, E. A. (1999). Associations of obesity markers, insulin, and sex hormones with HDL-cholesterol levels in Turkish and German individuals. *Atherosclerosis*, 145, 147-156.

Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A., & Laurent, G. (1999). Fibrinogen. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 31, 741-746.

Hinagata, J., Kakutani, M., Fujii, T., Naruko, T., Inoue, N., Fujita, Y. et al. (2006). Oxidized LDL receptor LOX-1 is involved in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury in a rat model. *Cardiovasc.Res.*, 69, 263-271.



Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K. et al. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, *420*, 333-336.

Hitsumoto, T., Ohsawa, H., Uchi, T., Noike, H., Kanai, M., Yoshinuma, M. et al. (2000). Preheparin serum lipoprotein lipase mass is negatively related to coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *153*, 391-396.

Hitsumoto, T., Takahashi, M., Iizuka, T., & Shirai, K. (2006). Relationship between preheparin lipoprotein lipase mass concentration in serum and bare metal stent restenosis. *J.Cardiol.*, *48*, 65-73.

Hitsumoto, T., Yoshinaga, K., Aoyagi, K., Sakurai, T., Kanai, M., Uchi, T. et al. (2002). Association between preheparin serum lipoprotein lipase mass and acute myocardial infarction in Japanese men. *J.Atheroscler.Thromb.*, *9*, 163-169.

Hodge, A. M., English, D. R., O'Dea, K., & Giles, G. G. (2004). Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *27*, 2701-2706.

Hodge, A. M., English, D. R., O'Dea, K., Sinclair, A. J., Makrides, M., Gibson, R. A. et al. (2007). Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am.J.Clin.Nutr.*, *86*, 189-197.

Hodgson, J. M., Wahlqvist, M. L., Boxall, J. A., & Balazs, N. D. (1993). Can linoleic acid contribute to coronary artery disease? *Am.J.Clin.Nutr.*, *58*, 228-234.

Hofnagel, O., Luechtenborg, B., Stolle, K., Lorkowski, S., Eschert, H., Plenz, G. et al. (2004). Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, *24*, 1789-1795.

Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J. S., Williams, L. M., Trayhurn, P., & Mercer, J. G. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *94*, 11073-11078.

Holven, K. B., Scholz, H., Halvorsen, B., Aukrust, P., Ose, L., & Nenseter, M. S. (2003). Hyperhomocysteinemic subjects have enhanced expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in mononuclear cells. *J.Nutr.*, *133*, 3588-3591.

Holzl, B., Iglseider, B., Sandhofer, A., Malaimare, L., Lang, J., Paulweber, B. et al. (2002). Insulin sensitivity is impaired in heterozygous carriers of lipoprotein lipase deficiency. *Diabetologia*, *45*, 378-384.

Homma, H., Kurachi, H., Nishio, Y., Takeda, T., Yamamoto, T., Adachi, K. et al. (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.

- Honjo, M., Nakamura, K., Yamashiro, K., Kiryu, J., Tanihara, H., McEvoy, L. M. et al. (2003). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 1274-1279.
- Hoogewerf, A. J., Cisar, L. A., Evans, D. C., & Bensadoun, A. (1991). Effect of chlorate on the sulfation of lipoprotein lipase and heparan sulfate proteoglycans. Sulfation of heparan sulfate proteoglycans affects lipoprotein lipase degradation. *J.Biol.Chem.*, 266, 16564-16571.
- Hooper, N. M., Karran, E. H., & Turner, A. J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem.J.*, 321 ( Pt 2), 265-279.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J.Clin.Invest*, 95, 2409-2415.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., & Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 271, 665-668.
- Howard, B. V. (1996). Risk factors for cardiovascular disease in individuals with diabetes. The Strong Heart Study. *Acta Diabetol.*, 33, 180-184.

Howard, B. V., Lee, E. T., Cowan, L. D., Devereux, R. B., Galloway, J. M., Go, O. T. et al. (1999). Rising tide of cardiovascular disease in American Indians. The Strong Heart Study. *Circulation*, 99, 2389-2395.

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

Hu, F. B., van Dam, R. M., & Liu, S. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, 44, 805-817.

Huang, A. L. & Vita, J. A. (2006). Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation. *Trends Cardiovasc.Med.*, 16, 15-20.

Hukshorn, C. J., van Dielen, F. M., Buurman, W. A., Westerterp-Plantenga, M. S., Campfield, L. A., & Saris, W. H. (2002). The effect of pegylated recombinant human leptin (PEG-OB) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, 26, 504-509.

Hussain, A., Claussen, B., Ramachandran, A., & Williams, R. (2007). Prevention of type 2 diabetes: a review. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 76, 317-326.

Ichikawa, T., Liang, J., Kitajima, S., Koike, T., Wang, X., Sun, H. et al. (2005). Macrophage-derived lipoprotein lipase increases aortic atherosclerosis in cholesterol-fed Tg rabbits. *Atherosclerosis*, 179, 87-95.

Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J. R., Heath, W., & King, G. L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89, 11059-11063.

Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M. et al. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49, 1939-1945.

Inoue, K., Arai, Y., Kurihara, H., Kita, T., & Sawamura, T. (2005). Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. *Circ.Res.*, 97, 176-184.

Ishii, H., Jirousek, M. R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A. et al. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*, 272, 728-731.

Ishino, S., Mukai, T., Kume, N., Asano, D., Ogawa, M., Kuge, Y. et al. (2007). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression is associated with atherosclerotic plaque instability-analysis in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, Epub ahead of print.

Isley, W. L., Miles, J. M., Patterson, B. W., & Harris, W. S. (2006). The effect of high-dose simvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J.Lipid Res.*, 47, 193-200.

Ismail, K., Winkley, K., & Rabe-Hesketh, S. (2004). Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials of psychological interventions to improve glycaemic control in patients with type 2 diabetes. *Lancet*, 363, 1589-1597.

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

Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieler, F., & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B-alpha. *Diabetes*, 51, 2005-2011.

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

Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., Sawamura, T., Fujita, M., Yanazume, T., Toyokuni, S. et al. (2001). Activation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation*, 104, 2948-2954.

Iwashima, Y., Eto, M., Hata, A., Kaku, K., Horiuchi, S., Ushikubi, F. et al. (2000). Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages.

*Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 277, 368-380.

James, M. J., Gibson, R. A., & Cleland, L. G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am.J.Clin.Nutr.*, 71, 343S-348S.

Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M. et al. (2005). Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity.*, 22, 551-560.

Jenkins, A. B., Furler, S. M., Bruce, D. G., & Chisholm, D. J. (1988). Regulation of hepatic glucose output during moderate exercise in non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*, 37, 966-972.

- Jensen, D. R., Schlaepfer, I. R., Morin, C. L., Pennington, D. S., Marcell, T., Ammon, S. M. et al. (1997). Prevention of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing skeletal muscle lipoprotein lipase. *Am.J.Physiol*, 273, R683-R689.
- Jiang, W. G., Bryce, R. P., Horrobin, D. F., & Mansel, R. E. (1998). Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 244, 414-420.
- Jiang, Z. Y., Lin, Y. W., Clemont, A., Feener, E. P., Hein, K. D., Igarashi, M. et al. (1999). Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (*fa/fa*) rats. *J.Clin.Invest*, 104, 447-457.
- Jindrichova, E., Kratochvilova, S., & Kovar, J. (2007). Glucose administration downregulates lipoprotein lipase activity in vivo: a study using repeated intravenous fat tolerance test. *Physiol Res.*, 56, 175-181.
- Jones, D. W., Chambless, L. E., Folsom, A. R., Heiss, G., Hutchinson, R. G., Sharrett, A. R. et al. (2002). Risk factors for coronary heart disease in African Americans: the atherosclerosis risk in communities study, 1987-1997. *Arch.Intern.Med.*, 162, 2565-2571.
- Jono, T., Miyazaki, A., Nagai, R., Sawamura, T., Kitamura, T., & 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.

Kakutani, M., Masaki, T., & Sawamura, T. (2000). A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 360-364.

Kakutani, M., Ueda, M., Naruko, T., Masaki, T., & Sawamura, T. (2001). Accumulation of LOX-1 ligand in plasma and atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: identification by a novel enzyme immunoassay. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 282, 180-185.

Kanata, S., Akagi, M., Nishimura, S., Hayakawa, S., Yoshida, K., Sawamura, T. et al. (2006). Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR-gamma. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 348, 1003-1010.

Kang, J., Robertson, R. J., Hagberg, J. M., Kelley, D. E., Goss, F. L., DaSilva, S. G. et al. (1996). Effect of exercise intensity on glucose and insulin metabolism in obese individuals and obese NIDDM patients. *Diabetes Care*, 19, 341-349.

Kang, S. M., Kwon, H. M., Hong, B. K., Kim, D., Kim, I. J., Choi, E. Y. et al. (2000). Expression of leptin receptor (Ob-R) in human atherosclerotic lesions: potential role in intimal neovascularization. *Yonsei Med.J.*, 41, 68-75.

Kardys, I., Knetsch, A. M., Bleumink, G. S., Deckers, J. W., Hofman, A., Stricker, B. H. et al. (2006). C-reactive protein and risk of heart failure. The Rotterdam Study. *Am.Heart J.*, 152, 514-520.

Karim, R., Buchanan, T. A., Hodis, H. N., Li, Y., & Mack, W. J. (2005). The association of smoking and subclinical atherosclerosis in Type 2 diabetes: modification by duration of diabetes. *Diabet.Med.*, 22, 81-87.

Karpe, F., Olivecrona, T., Olivecrona, G., Samra, J. S., Summers, L. K., Humphreys, S. M. et al. (1998). Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations. *J.Lipid Res.*, 39, 2387-2393.

Kastelein, J. J., Jukema, J. W., Zwinderman, A. H., Clee, S., van Boven, A. J., Jansen, H. et al. (2000). Lipoprotein lipase activity is associated with severity of angina pectoris. REGRESS Study Group. *Circulation*, 102, 1629-1633.

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Morimoto, M., Hayashida, K. et al. (2001). Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL

receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 21, 955-960.

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T. et al. (2000). Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding. *J.Biol.Chem.*, 275, 6573-6579.

Katsuki, A., Sumida, Y., Murashima, S., Murata, K., Takarada, Y., Ito, K. et al. (1998). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 83, 859-862.

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

Kawana, M., Lee, M. E., Quertermous, E. E., & Quertermous, T. (1995). Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol.Cell Biol.*, 15, 4225-4231.

- Kazumi, T., Kawaguchi, A., Hirano, T., & Yoshino, G. (2003). C-reactive protein in young, apparently healthy men: associations with serum leptin, QTc interval, and high-density lipoprotein-cholesterol. *Metabolism, 52*, 1113-1116.
- Kearney, M. T., Duncan, E. R., Kahn, M., & Wheatcroft, S. B. (2008). Insulin resistance and endothelial cell dysfunction: studies in mammalian models. *Exp.Physiol, 93*, 158-163.
- Keech, A., Simes, R. J., Barter, P., Best, J., Scott, R., Taskinen, M. R. et al. (2005). Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet, 366*, 1849-1861.
- Kelley, D. E., Mokan, M., & Mandarino, L. J. (1992). Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes, 41*, 698-706.
- Kelly, A. S. & Bank, A. J. (2007). The cardiovascular effects of the thiazolidinediones: a review of the clinical data. *J.Diabetes Complications, 21*, 326-334.
- 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., & 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., Ranganathan, G., Yukht, A., Ong, J. M., & Davis, R. C. (1996). Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J.Lipid Res.*, 37, 2332-2340.

Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., & 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., & 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.

Khachigian, L. M., Resnick, N., Gimbrone, M. A., Jr., & Collins, T. (1995). Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J.Clin.Invest*, 96, 1169-1175.

Khalfallah, Y., Sassolas, G., Borson-Chazot, F., Vega, N., & 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.

Khera, A., de Lemos, J. A., Peshock, R. M., Lo, H. S., Stanek, H. G., Murphy, S. A.

et al. (2006). Relationship between C-reactive protein and subclinical atherosclerosis: the Dallas Heart Study. *Circulation*, *113*, 38-43.

Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P., & Steinberg, D. (1988). Enhanced

macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation.

*Arteriosclerosis*, *8*, 348-358.

Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L. A., & Filep, J. G. (2005). Loss of pentameric

symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circ.Res.*, *97*, 690-697.

Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L. A., & Filep, J. G. (2004). Conformational

rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation*, *109*, 2016-2022.

Kiens, B., Lithell, H., Mikines, K. J., & Richter, E. A. (1989). Effects of insulin and

exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J.Clin.Invest*, *84*, 1124-1129.

Kim, F., Gallis, B., & Corson, M. A. (2001a). TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 280, C1057-C1065.

Kim, J. A., Montagnani, M., Koh, K. K., & Quon, M. J. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 113, 1888-1904.

Kim, J. K., Fillmore, J. J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I. K., Pypaert, M. et al. (2001b). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 7522-7527.

King, D. E., Mainous, A. G., III, Buchanan, T. A., & Pearson, W. S. (2003). C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care*, 26, 1535-1539.

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

King, H., Aubert, R. E., & Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21, 1414-1431.

Kita, T., Kume, N., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., & Yokode, M. (1999). Oxidized LDL and expression of monocyte adhesion molecules. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, *45*, 123-126.

Kita, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Murayama, T., Sano, H. et al. (2001). Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, *947*, 199-205.

Kitajima, S., Morimoto, M., Liu, E., Koike, T., Higaki, Y., Taura, Y. et al. (2004). Overexpression of lipoprotein lipase improves insulin resistance induced by a high-fat diet in transgenic rabbits. *Diabetologia*, *47*, 1202-1209.

Kivimaki, M., Lawlor, D. A., Juonala, M., Smith, G. D., Elovainio, M., Keltikangas-Jarvinen, L. et al. (2005). Lifecourse socioeconomic position, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, *25*, 2197-2202.

Kjerrulf, M., Berke, Z., Aspegren, A., Umaerus, M., Nilsson, T., Svensson, L. et al. (2006). Reduced cholesterol accumulation by leptin deficient (ob/ob) mouse macrophages. *Inflamm.Res.*, *55*, 300-309.

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



Knudson, J. D., Dincer, U. D., Dick, G. M., Shibata, H., Akahane, R., Saito, M. et al. (2005). Leptin resistance extends to the coronary vasculature in prediabetic dogs and provides a protective adaptation against endothelial dysfunction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 289, H1038-H1046.

Kobayashi, S., Inoue, N., Ohashi, Y., Terashima, M., Matsui, K., Mori, T. et al. (2003). Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, 1398-1404.

Koh, K. K., Han, S. H., Quon, M. J., Yeal, A. J., & Shin, E. K. (2005a). Beneficial effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hypertriglyceridemia. *Diabetes Care*, 28, 1419-1424.

Koh, K. K., Quon, M. J., Han, S. H., Ahn, J. Y., Jin, D. K., Kim, H. S. et al. (2005b). Vascular and metabolic effects of combined therapy with ramipril and simvastatin in patients with type 2 diabetes. *Hypertension*, 45, 1088-1093.

Koh, K. K., Quon, M. J., Han, S. H., Chung, W. J., Ahn, J. Y., Seo, Y. H. et al. (2004). Additive beneficial effects of losartan combined with simvastatin in the treatment of hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Circulation*, 110, 3687-3692.

Koike, T., Liang, J., Wang, X., Ichikawa, T., Shiomi, M., Liu, G. et al. (2004). Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits improves hyperlipidemia and obesity. *J.Biol.Chem.*, 279, 7521-7529.

Koivisto, V. A., Pelkonen, R., Nikkila, E. A., & Heding, L. G. (1984). Human and porcine insulins are equally effective in the regulation of glucose kinetics of diabetic patients during exercise. *Acta Endocrinol.(Copenh)*, 107, 500-505.

Konukoglu, D., Serin, O., & Turhan, M. S. (2006). Plasma leptin and its relationship with lipid peroxidation and nitric oxide in obese female patients with or without hypertension. *Arch.Med.Res.*, 37, 602-606.

Kopp, H. P., Kopp, C. W., Festa, A., Krzyzanowska, K., Kriwanek, S., Minar, E. et al. (2003). Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, 1042-1047.

Koppes, L. L., Dekker, J. M., Hendriks, H. F., Bouter, L. M., & Heine, R. J. (2005). Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care*, 28, 719-725.

Kota, R. S., Ramana, C. V., Tenorio, F. A., Enelow, R. I., & Rutledge, J. C. (2005). Differential effects of lipoprotein lipase on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma-mediated gene expression in human endothelial cells.

*J.Biol.Chem.*, 280, 31076-31084.

Kounnas, M. Z., Chappell, D. A., Strickland, D. K., & Argraves, W. S. (1993).

Glycoprotein 330, a member of the low density lipoprotein receptor family, binds lipoprotein lipase in vitro. *J.Biol.Chem.*, 268, 14176-14181.

Kovacs, A., Tornvall, P., Nilsson, R., Tegner, J., Hamsten, A., & Bjorkegren, J.

(2007). Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 13768-13773.

Kowalska, I., Straczkowski, M., & Kinalska, I. (1998). Levels of leptin in plasma of patients with type 2 diabetes. *Pol.Arch.Med.Wewn.*, 99, 470-476.

Koya, D. & King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47, 859-866.

Kraemer, F. B., Takeda, D., Natsu, V., & Sztalryd, C. (1998). Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin- and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism*, 47, 555-559.

Krausz, Y., Bar-On, H., & Shafir, E. (1981). Origin and pattern of glucocorticoid-induced hyperlipidemia in rats. Dose-dependent bimodal changes in serum lipids and lipoproteins in relation to hepatic lipogenesis and tissue lipoprotein lipase activity. *Biochim.Biophys.Acta*, 663, 69-82.

Krentz, A. J. (2003). Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab*, 5 Suppl 1, S19-S27.

Kuchan, M. J. & Frangos, J. A. (1993). Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am.J.Physiol*, 264, H150-H156.

Kume, N. & Kita, T. (2001). Roles of lectin-like oxidized LDL receptor-1 and its soluble forms in atherogenesis. *Curr.Opin.Lipidol.*, 12, 419-423.

Kume, N. & Kita, T. (2004). Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1 and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ.Res.*, 94, 269-270.

Kume, N., Murase, T., Moriwaki, H., Aoyama, T., Sawamura, T., Masaki, T. et al. (1998). Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ.Res.*, 83, 322-327.

Kunt, T., Forst, T., Wilhelm, A., Tritschler, H., Pfoetzner, A., Harzer, O. et al. (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., Iwata, K., Yin, W., Nakamura, T., Ogawa, H. et al. (2005). NO-1886 (ibrolipim), a lipoprotein lipase activator, increases the expression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle and suppresses fat accumulation in high-fat diet-induced obesity in rats. *Metabolism*, 54, 1587-1592.

Kutlu, S., Canpolat, S., Aydin, M., Yasar, A., Tuzcu, M., & Baydas, G. (2005). Exogenous leptin increases lipid peroxidation in the mouse brain. *Tohoku J.Exp.Med.*, 206, 233-236.

Kwok, C. F., Shih, K. C., Hwu, C. M., & Ho, L. T. (2000). Linoleic acid and oleic acid increase the endothelin-1 binding and action in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Metabolism*, 49, 1386-1389.

Laaksonen, D. E., Lindstrom, J., Lakka, T. A., Eriksson, J. G., Niskanen, L., Wikstrom, K. et al. (2005). Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish diabetes prevention study. *Diabetes*, 54, 158-165.

Laing, S. P., Swerdlow, A. J., Slater, S. D., Burden, A. C., Morris, A., Waugh, N. R. et al. (2003). Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*, 46, 760-765.

Lambert, E. V., Wooding, G., Lambert, M. I., Koeslag, J. H., & 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.

Lappas, M., Permezel, M., & Rice, G. E. (2005). Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology*, 146, 3334-3342.

Lapsys, N. M., Kriketos, A. D., Lim-Fraser, M., Poynten, A. M., Lowy, A., Furler, S. M. et al. (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.

Lau, D. C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P. E., & Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 288, H2031-H2041.

Laville, M., Auboeuf, D., Khalifallah, Y., Vega, N., Riou, J. P., & 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.

Lebovitz, H. E. & Banerji, M. A. (2005). Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care*, 28, 2322-2325.

Lee, A. J., Fowkes, F. G., Lowe, G. D., Connor, J. M., & Rumley, A. (1999). Fibrinogen, factor VII and PAI-1 genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study. *Thromb.Haemost.*, 81, 553-560.

Lee, J. H., Bullen, J. W., Jr., Stoyneva, V. L., & Mantzoros, C. S. (2005). Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 288, E625-E632.

Lee, J. H., Chan, J. L., Yiannakouris, N., Kontogianni, M., Estrada, E., Seip, R. et al. (2003). Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 88, 4848-4856.

Lehr, H. A. (2000). Microcirculatory dysfunction induced by cigarette smoking.

*Microcirculation.*, 7, 367-384.

Leinonen, E., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., Hulten, L. M., Hiukka, A., & Taskinen, M. R. (2003). Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 166, 387-394.

Lemieux, I., Almeras, N., Mauriege, P., Blanchet, C., Dewailly, E., Bergeron, J. et al. (2002). Prevalence of 'hypertriglyceridemic waist' in men who participated in the Quebec Health Survey: association with atherogenic and diabetogenic metabolic risk factors. *Can.J.Cardiol.*, 18, 725-732.

Letcher, R. L., Chien, S., Pickering, T. G., Sealey, J. E., & Laragh, J. H. (1981).

Direct relationship between blood pressure and blood viscosity in normal and hypertensive subjects. Role of fibrinogen and concentration. *Am.J.Med.*, 70, 1195-1202.

Levinson, S. S. (2006). Inflammatory and long-term risk markers. *Clin.Lab Med.*, 26, 553-70, v.

Li, A. E., Ito, H., Rovira, I. I., Kim, K. S., Takeda, K., Yu, Z. Y. et al. (1999a). A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ.Res.*, 85, 304-310.



Li, D., Chen, H., Romeo, F., Sawamura, T., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2002a). Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1.

*J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 302, 601-605.

Li, D., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., & Mehta, J. L. (2003). LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, 816-821.

Li, D., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., Ranganathan, S., & Mehta, J. L. (2003a). LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 107, 612-617.

Li, D. & Mehta, J. L. (2000a). Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 101, 2889-2895.

Li, D. & Mehta, J. L. (2000b). Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20, 1116-1122.

Li, D., Singh, R. M., Liu, L., Chen, H., Singh, B. M., Kazzaz, N. et al. (2003b).

Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc.Res.*, 57, 238-243.

Li, D., Williams, V., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., Romeo, F. et al. (2003c).

Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 41, 1048-1055.

Li, D. Y., Zhang, Y. C., Philips, M. I., Sawamura, T., & Mehta, J. L. (1999b).

Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ.Res.*, 84, 1043-1049.

Li, H., Junk, P., Huwiler, A., Burkhardt, C., Wallerath, T., Pfeilschifter, J. et al.

(2002b). Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase.

*Circulation*, 106, 2250-2256.

Li, L. & Renier, G. (2008). The oral anti-diabetic agent, gliclazide, inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, metalloproteinase-9 secretion and apoptosis in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis. Epub ahead of print.*

Li, L., Mamputu, J. C., Wiernsperger, N., & Renier, G. (2005). Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin. *Diabetes, 54*, 2227-2234.

Li, L., Roumeliotis, N., Sawamura, T., & Renier, G. (2004a). C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ.Res.*, *95*, 877-883.

Li, L., Sawamura, T., & Renier, G. (2003d). Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium. *Diabetes, 52*, 1843-1850.

Li, L., Sawamura, T., & Renier, G. (2004b). Glucose enhances human macrophage LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced macrophage foam cell formation. *Circ.Res.*, *94*, 892-901.

Libby, P. (2006). Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am.J.Clin.Nutr.*, *83*, 456S-460S.

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

Libby, P. & Plutzky, J. (2007). Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Am.J.Cardiol.*, 99, 27B-40B.

Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-1143.

Lim, M. Y., Wang, H., Kapoun, A. M., O'connell, M., O'Young, G., Brauer, H. A. et al. (2004). p38 Inhibition attenuates the pro-inflammatory response to C-reactive protein by human peripheral blood mononuclear cells. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 37, 1111-1114.

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

Lindsay, R. S., Funahashi, T., Hanson, R. L., Matsuzawa, Y., Tanaka, S., Tataranni, P. A. et al. (2002). Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*, 360, 57-58.

Liu, W., Schoenkerman, A., & Lowe, W. L., Jr. (2000). Activation of members of the mitogen-activated protein kinase family by glucose in endothelial cells.

*Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 279, E782-E790.

Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuffi, A. G., Pepys, M. B. et al. (1994). The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N.Engl.J.Med.*, 331, 417-424.

Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J. et al. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.*, 12, 57-65.

Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M. J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M. et al. (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N.Engl.J.Med.*, 354, 1567-1577.

Lookene, A., Chevreuril, O., Ostergaard, P., & Olivecrona, G. (1996). Interaction of lipoprotein lipase with heparin fragments and with heparan sulfate: stoichiometry, stabilization, and kinetics. *Biochemistry*, 35, 12155-12163.

Lookene, A. & gtsson-Olivecrona, G. (1993). Chymotryptic cleavage of lipoprotein lipase. Identification of cleavage sites and functional studies of the truncated molecule. *Eur.J.Biochem.*, 213, 185-194.

Lowell, B. B. & Shulman, G. I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, 307, 384-387.

Luft, F. C., Steinberg, H., Ganten, U., Meyer, D., Gless, K. H., Lang, R. E. et al. (1988). Effect of sodium chloride and sodium bicarbonate on blood pressure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin.Sci.(Lond)*, 74, 577-585.

Lundasen, T., Liao, W., Angelin, B., & Rudling, M. (2003). Leptin induces the hepatic high density lipoprotein receptor scavenger receptor B type I (SR-BI) but not cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) in leptin-deficient (ob/ob) mice. *J.Biol.Chem.*, 278, 43224-43228.

Luo, J., Rizkalla, S. W., Vidal, H., Oppert, J. M., Colas, C., Boussairi, A. et al. (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.

Luostarinen, R., Boberg, M., & Saldeen, T. (1993). Fatty acid composition in total phospholipids of human coronary arteries in sudden cardiac death. *Atherosclerosis*, 99, 187-193.

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

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241.

Lustman, P. J., Anderson, R. J., Freedland, K. E., de, G. M., Carney, R. M., & Clouse, R. E. (2000). Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care*, 23, 934-942.

Ma, Y., Henderson, H. E., Liu, M. S., Zhang, H., Forsythe, I. J., Clarke-Lewis, I. et al. (1994). Mutagenesis in four candidate heparin binding regions (residues 279-282, 291-304, 390-393, and 439-448) and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. *J.Lipid Res.*, 35, 2049-2059.

Macleod, K., Leprince, D., & Stehelin, D. (1992). The ets gene family. *Trends Biochem.Sci.*, 17, 251-256.

Malek, A. M., Greene, A. L., & Izumo, S. (1993). Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 5999-6003.

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

Mancia, G. (2005). The association of hypertension and diabetes: prevalence, cardiovascular risk and protection by blood pressure reduction. *Acta Diabetol.*, 42 Suppl 1, S17-S25.

Mangoni, A. A. & Jackson, S. H. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am.J.Med.*, 112, 556-565.

Mannucci, P. M. (1998). von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 1359-1362.

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

Mantha, L., Russell, J. C., Brindley, D. N., & 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, B. A., Marchioli, R., & Di, M. G. (1999). Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 1368-1377.



Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G., & Hill, R. A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, 26, 1407-1433.

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

Marsche, G., Levak-Frank, S., Quehenberger, O., Heller, R., Sattler, W., & Malle, E. (2001). Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J.*, 15, 1095-1097.

Martin, I. K., Katz, A., & Wahren, J. (1995). Splanchnic and muscle metabolism during exercise in NIDDM patients. *Am.J.Physiol*, 269, E583-E590.

Massaro, M. & De, C. R. (2002). Vasculoprotective effects of oleic acid: epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties. *Nutr.Metab Cardiovasc.Dis.*, 12, 42-51.

Massi-Benedetti, M. & Federici, M. O. (1999). Cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: the role of hyperglycaemia. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, 107 Suppl 4, S120-S123.

McCarthy, M. I., Froguel, P., & Hitman, G. A. (1994). The genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus: tools and aims. *Diabetologia*, 37, 959-968.

McDermott, M. M. (2007). The international pandemic of chronic cardiovascular disease. *JAMA*, 297, 1253-1255.

McIlhargey, T. L., Yang, Y., Wong, H., & Hill, J. S. (2003). Identification of a lipoprotein lipase cofactor-binding site by chemical cross-linking and transfer of apolipoprotein C-II-responsive lipolysis from lipoprotein lipase to hepatic lipase. *J.Biol.Chem.*, 278, 23027-23035.

McNeely, M. J., Boyko, E. J., Weigle, D. S., Shofer, J. B., Chessler, S. D., Leonetti, D. L. et al. (1999). Association between baseline plasma leptin levels and subsequent development of diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care*, 22, 65-70.

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

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

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

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

Meerarani, P., Smart, E. J., Toborek, M., Boissonneault, G. A., & Hennig, B. (2003). Cholesterol attenuates linoleic acid-induced endothelial cell activation. *Metabolism*, 52, 493-500.

Mehta, J. L., Chen, J., Hermonat, P. L., Romeo, F., & Novelli, G. (2006). Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc.Res.*, 69, 36-45.

Mehta, J. L., Chen, J., Yu, F., & Li, D. Y. (2004). Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc.Res.*, 64, 243-249.

Mehta, J. L. & Li, D. Y. (1998). Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 248, 511-514.

Mehta, J. L., Li, D. Y., Chen, H. J., Joseph, J., & Romeo, F. (2001). Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS.

*Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 289, 857-861.

Merkel, M., Kako, Y., Radner, H., Cho, I. S., Ramasamy, R., Brunzell, J. D. et al. (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. et al. (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.

Meyer, A. A., Kundt, G., Steiner, M., Schuff-Werner, P., & Kienast, W. (2006). Impaired flow-mediated vasodilation, carotid artery intima-media thickening, and elevated endothelial plasma markers in obese children: the impact of cardiovascular risk factors. *Pediatrics*, 117, 1560-1567.

Meyer, K. A., Kushi, L. H., Jacobs, D. R., Jr., & Folsom, A. R. (2001). Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. *Diabetes Care*, 24, 1528-1535.

Michaud, S. E. & Renier, G. (2001). Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes*, *50*, 660-666.

Miele, C., Riboulet, A., Maitan, M. A., Oriente, F., Romano, C., Formisano, P. et al. (2003). Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J.Biol.Chem.*, *278*, 47376-47387.

Miettinen, H., Lehto, S., Salomaa, V., Mahonen, M., Niemela, M., Haffner, S. M. et al. (1998). Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care*, *21*, 69-75.

Milewicz, A., Tworowska, U., & Demissie, M. (2001). Menopausal obesity--myth or fact? *Climacteric.*, *4*, 273-283.

Minami, M., Kume, N., Kataoka, H., Morimoto, M., Hayashida, K., Sawamura, T. et al. (2000). Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *272*, 357-361.

Minnich, A., Kessling, A., Roy, M., Giry, C., DeLangavant, G., Lavigne, J. et al. (1995). Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patients of French Canadian descent. *J.Lipid Res.*, *36*, 117-124.

Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D. et al. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, *415*, 339-343.

Minuk, H. L., Vranic, M., Marliss, E. B., Hanna, A. K., Albisser, A. M., & Zinman, B. (1981). Glucoregulatory and metabolic response to exercise in obese noninsulin-dependent diabetes. *Am.J.Physiol*, *240*, E458-E464.

Mishima, Y., Kuyama, A., Tada, A., Takahashi, K., Ishioka, T., & Kibata, M. (2001). Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, *52*, 119-123.

Mocatta, T. J., Pilbrow, A. P., Cameron, V. A., Senthilmohan, R., Frampton, C. M., Richards, A. M. et al. (2007). Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.*, *49*, 1993-2000.

Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A., Garg, R., & Dandona, P. (2002). Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am.J.Clin.Nutr.*, *75*, 767-772.

Montagnani, M., Ravichandran, L. V., Chen, H., Esposito, D. L., & Quon, M. J. (2002). Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are

required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells.

*Mol.Endocrinol.*, 16, 1931-1942.

Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J. et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387, 903-908.

Montonen, J., Knekt, P., Harkanen, T., Jarvinen, R., Heliövaara, M., Aromaa, A. et al. (2005). Dietary patterns and the incidence of type 2 diabetes. *Am.J.Epidemiol.*, 161, 219-227.

Morawietz, H., Duerschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., & Holtz, J. (2001). Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 284, 961-965.

Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., Duerschmidt, N., Galle, J., Hakim, K. et al. (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 100, 899-902.

Morishita, K., Johnson, D. E., & Williams, L. T. (1995). A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J.Biol.Chem.*, 270, 27948-27953.

Moriwaki, H., Kume, N., Kataoka, H., Murase, T., Nishi, E., Sawamura, T. et al. (1998a). Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha. *FEBS Lett.*, *440*, 29-32.

Moriwaki, H., Kume, N., Sawamura, T., Aoyama, T., Hoshikawa, H., Ochi, H. et al. (1998b). Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *18*, 1541-1547.

Morrow, J. D., Minton, T. A., & Roberts, L. J. (1992). The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins*, *44*, 155-163.

Moschen, A. R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H. et al. (2007). Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol.*, *178*, 1748-1758.

Mozaffarian, D. (2006). Trans fatty acids - effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler. Suppl*, *7*, 29-32.

Muller, S., Martin, S., Koenig, W., Hanifi-Moghaddam, P., Rathmann, W., Haastert, B. et al. (2002). Impaired glucose tolerance is associated with increased serum



concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia*, 45, 805-812.

Murase, T., Kume, N., Korenaga, R., Ando, J., Sawamura, T., Masaki, T. et al. (1998). Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ.Res.*, 83, 328-333.

Murphy, M. C., Zampelas, A., Puddicombe, S. M., Furlonger, N. P., Morgan, L. M., & 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.

Muscoli, C., Sacco, I., Alecce, W., Palma, E., Nistico, R., Costa, N. et al. (2004). The protective effect of superoxide dismutase mimetic M40401 on balloon injury-related neointima formation: role of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 311, 44-50.

Nagase, M., Abe, J., Takahashi, K., Ando, J., Hirose, S., & Fujita, T. (1998). Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) gene. *J.Biol.Chem.*, 273, 33702-33707.

Nagase, M., Ando, K., Nagase, T., Kaname, S., Sawamura, T., & Fujita, T. (2001). Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium.

*Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 281, 720-725.

Nagase, M., Hirose, S., Sawamura, T., Masaki, T., & Fujita, T. (1997). Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 237, 496-498.

Nakagami, H., Morishita, R., Yamamoto, K., Yoshimura, S. I., Taniyama, Y., Aoki, M. et al. (2001). Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes*, 50, 1472-1481.

Nakagawa, T., Akagi, M., Hoshikawa, H., Chen, M., Yasuda, T., Mukai, S. et al. (2002a). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46, 2486-2494.

Nakagawa, T., Yasuda, T., Hoshikawa, H., Shimizu, M., Kakinuma, T., Chen, M. et al. (2002b). LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt.

*Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 299, 91-97.

- Nakamura, A., Harada, N., Takahashi, A., Mawatari, K., Nakano, M., Tsutsumi, K. et al. (2007). NO-1886, a lipoprotein lipase activator, attenuates vascular smooth muscle contraction in rat aorta. *Eur.J.Pharmacol.*, 554, 183-190.
- Nakanishi, S., Yamane, K., Kamei, N., Nojima, H., Okubo, M., & Kohno, N. (2005). A protective effect of adiponectin against oxidative stress in Japanese Americans: the association between adiponectin or leptin and urinary isoprostane. *Metabolism*, 54, 194-199.
- Nakata, M., Yada, T., Soejima, N., & Maruyama, I. (1999). Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes*, 48, 426-429.
- Nam, S. Y. & Marcus, C. (2000). Growth hormone and adipocyte function in obesity. *Horm.Res.*, 53 Suppl 1, 87-97.
- Nambi, V. (2005). The use of myeloperoxidase as a risk marker for atherosclerosis. *Curr.Atheroscler.Rep.*, 7, 127-131.
- Napoleone, E., Di, S. A., Amore, C., Baccante, G., Di, F. C., Porreca, E. et al. (2007). Leptin induces tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells: a possible link between obesity and cardiovascular risk? *J.Thromb.Haemost.*

Napolitano, M., Blotta, I., Montali, A., & Bravo, E. (2001). 17beta-estradiol enhances the flux of cholesterol through the cholesteryl ester cycle in human macrophages. *Biosci.Rep.*, 21, 637-652.

Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J. et al. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 16, 831-842.

Nierman, M. C., Rip, J., Twisk, J., Meulenberg, J. J., Kastelein, J. J., Stroes, E. S. et al. (2005). Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. *Neth.J.Med.*, 63, 14-19.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y. et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787-790.

Nordestgaard, B. G. & Nielsen, L. B. (1994). Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr.Opin.Lipidol.*, 5, 252-257.

Nyholm, B., Fisker, S., Lund, S., Moller, N., & Schmitz, O. (1997). Increased circulating leptin concentrations in insulin-resistant first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: relationship to body composition and

insulin sensitivity but not to family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur.J.Endocrinol.*, 136, 173-179.

O'Brien, K. D., Gordon, D., Deeb, S., Ferguson, M., & Chait, A. (1992). Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J.Clin.Invest*, 89, 1544-1550.

O'Donnell, V. B. & Freeman, B. A. (2001). Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ.Res.*, 88, 12-21.

O'Rourke, L., Yeaman, S. J., & Shepherd, P. R. (2001). Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes*, 50, 955-961.

Obregon, M. J., Jacobsson, A., Kirchgessner, T., Schotz, M. C., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1989). Postnatal recruitment of brown adipose tissue is induced by the cold stress experienced by the pups. An analysis of mRNA levels for thermogenin and lipoprotein lipase. *Biochem.J.*, 259, 341-346.

Obunike, J. C., Paka, S., Pillarisetti, S., & Goldberg, I. J. (1997). Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 17, 1414-1420.

Oda, A., Taniguchi, T., & Yokoyama, M. (2001). Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J.Med.Sci.*, 47, 141-150.

Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., & Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 45, 881-885.

Oflaz, H., Ozbey, N., Mantar, F., Genchellac, H., Mercanoglu, F., Sencer, E. et al. (2003). Determination of endothelial function and early atherosclerotic changes in healthy obese women. *Diabetes Nutr.Metab*, 16, 176-181.

Ohno, M., Cooke, J. P., Dzau, V. J., & Gibbons, G. H. (1995). Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J.Clin.Invest*, 95, 1363-1369.

Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T. et al. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 9535-9540.

Olivecrona, T., Bergo, M., Hultin, M., & Olivecrona, G. (1995). Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can.J.Cardiol.*, 11 Suppl G, 73G-78G.

Ong, J. M. & Kern, P. A. (1989b). The role of glucose and glycosylation in the regulation of lipoprotein lipase synthesis and secretion in rat adipocytes.

*J.Biol.Chem.*, 264, 3177-3182.

Ong, J. M. & Kern, P. A. (1989a). 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., Simsolo, R. B., Saffari, B., & Kern, P. A. (1992). The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adipocytes.

*Endocrinology*, 130, 2310-2316.

Ong, J. M., Simsolo, R. B., Saghizadeh, M., Pauer, A., & Kern, P. A. (1994).

Expression of lipoprotein lipase in rat muscle: regulation by feeding and hypothyroidism. *J.Lipid Res.*, 35, 1542-1551.

Orchard, T. J. (1999). Glycemic control and CAD risk: a heretical thought. *Diabetes Care*, 22, 1220.

Osborne, J. C., Jr., Bengtsson-Olivecrona, G., Lee, N. S., & Olivecrona, T. (1985).

Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry*, 24, 5606-5611.

Oscarsson, J., Ottosson, M., Vikman-Adolfsson, K., Frick, F., Enerback, S., Lithell, H. et al. (1999). GH but not IGF-I or insulin increases lipoprotein lipase activity in muscle tissues of hypophysectomised rats. *J.Endocrinol.*, 160, 247-255.

Ouslimani, N., Mahrouf, M., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Cosson, C., Legrand, A. et al. (2007). Metformin reduces endothelial cell expression of both the receptor for advanced glycation end products and lectin-like oxidized receptor 1. *Metabolism*, 56, 308-313.

Ozata, M., Avcu, F., Durmus, O., Yilmaz, I., Ozdemir, I. C., & Yalcin, A. (2001a). Leptin does not play a major role in platelet aggregation in obesity and leptin deficiency. *Obes.Res.*, 9, 627-630.

Ozata, M., Gungor, D., Turan, M., Ozisik, G., Bingol, N., Ozgurtas, T. et al. (2001b). Improved glycemic control increases fasting plasma acylation-stimulating protein and decreases leptin concentrations in type II diabetic subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 86, 3659-3664.

Packard, C. J., O'Reilly, D. S., Caslake, M. J., McMahon, A. D., Ford, I., Cooney, J. et al. (2000). Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.*, 343, 1148-1155.



- Page, S., Judson, A., Melford, K., & Bensadoun, A. (2006). Interaction of lipoprotein lipase and receptor-associated protein. *J.Biol.Chem.*, *281*, 13931-13938.
- Panunti, B., Kunhiraman, B., & Fonseca, V. (2005). The impact of antidiabetic therapies on cardiovascular disease. *Curr.Atheroscler.Rep.*, *7*, 50-57.
- Pappan, K. L., Pan, Z., Kwon, G., Marshall, C. A., Coleman, T., Goldberg, I. J. et al. (2005). Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. *J.Biol.Chem.*, *280*, 9023-9029.
- Parhami, F., Tintut, Y., Ballard, A., Fogelman, A. M., & Demer, L. L. (2001). Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ.Res.*, *88*, 954-960.
- Park, J. Y., Kim, Y. M., Song, H. S., Park, K. Y., Kim, Y. M., Kim, M. S. et al. (2003). Oleic acid induces endothelin-1 expression through activation of protein kinase C and NF-kappa B. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, *303*, 891-895.
- Park, S. H., Marso, S. P., Zhou, Z., Foroudi, F., Topol, E. J., & Lincoff, A. M. (2001). Neointimal hyperplasia after arterial injury is increased in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*, *104*, 815-819.

Pasceri, V., Willerson, J. T., & Yeh, E. T. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, *102*, 2165-2168.

Paul, A., Ko, K. W., Li, L., Yechoor, V., McCrory, M. A., Szalai, A. J. et al. (2004). C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, *109*, 647-655.

Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. (2007). Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J.Appl.Physiol*, *102*, 814-816.

Peng, H. B., Libby, P., & Liao, J. K. (1995). Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J.Biol.Chem.*, *270*, 14214-14219.

Pepys, M. B. & Baltz, M. L. (1983). Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv.Immunol.*, *34*, 141-212.

Pepys, M. B., Hirschfield, G. M., Tennent, G. A., Gallimore, J. R., Kahan, M. C., Bellotti, V. et al. (2006). Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*, *440*, 1217-1221.

Petersen, E. W., Carey, A. L., Sacchetti, M., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Febbraio, M. A. et al. (2005). Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 288, E155-E162.

Petersen, K. F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D. L. et al. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*, 300, 1140-1142.

Pfeifer, M. A., Brunzell, J. D., Best, J. D., Judzewitsch, R. G., Halter, J. B., & 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., Naimi, N., Richard, D., & Deshaies, Y. (1999). Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes*, 48, 452-459.

Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D., & Burt, D. (1997). NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 40, 1286-1292.

Pickup, J. C., Roberts, G. A., Kehely, A. M., Pasapula, C., Chusney, G. D., & Mather, H. M. (1997). Higher serum sialic acid in women than in men with NIDDM:

possible relevance to increased cardiovascular risk in NIDDM women. *Diabetes Care*, 20, 1496.

Plomgaard, P., Bouzakri, K., Krogh-Madsen, R., Mittendorfer, B., Zierath, J. R., & Pedersen, B. K. (2005). Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*, 54, 2939-2945.

Porreca, E., Di, F. C., Fusco, L., Moretta, V., Di, N. M., & Cuccurullo, F. (2004a). Soluble thrombomodulin and vascular adhesion molecule-1 are associated to leptin plasma levels in obese women. *Atherosclerosis*, 172, 175-180.

Porreca, E., Di, F. C., Moretta, V., Angelini, A., Guglielmi, M. D., Di, N. M. et al. (2004b). Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 175, 139-143.

Porreca, E., Di, F. C., Vitacolonna, E., Baccante, G., Di, C. A., Angelini, A. et al. (2002). Transforming growth factor-beta1 levels in hypertensive patients: association with body mass index and leptin. *Am.J.Hypertens.*, 15, 759-765.

Potempa, L. A., Siegel, J. N., Fiedel, B. A., Potempa, R. T., & Gewurz, H. (1987). Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Mol.Immunol.*, 24, 531-541.

Poulsen, P., Kyvik, K. O., Vaag, A., & Beck-Nielsen, H. (1999). Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*, *42*, 139-145.

Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., & 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., & 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.

Prescott, J., Owens, D., Collins, P., Johnson, A., & Tomkin, G. H. (1999). The fatty acid distribution in low density lipoprotein in diabetes. *Biochim.Biophys.Acta*, *1439*, 110-116.

Price, S. R., Olivecrona, T., & 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.

Qiu, G., Ho, A. C., Yu, W., & Hill, J. S. (2007). Suppression of endothelial or lipoprotein lipase in THP-1 macrophages attenuates proinflammatory cytokine secretion. *J.Lipid Res.*, *48*, 385-394.

Quehenberger, P., Exner, M., Sunder-Plassmann, R., Ruzicka, K., Bieglmayer, C., Ender, G. et al. (2002). Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ.Res.*, 90, 711-718.

Querfeld, U., Ong, J. M., Prehn, J., Carty, J., Saffari, B., Jordan, S. C. et al. (1990). Effects of cytokines on the production of lipoprotein lipase in cultured human macrophages. *J.Lipid Res.*, 31, 1379-1386.

Radomski, M. W. & Orme, T. (1971). Response of lipoprotein lipase in various tissues to cold exposure. *Am.J.Physiol.*, 220, 1852-1856.

Rainwater, D. L., Comuzzie, A. G., VandeBerg, J. L., Mahaney, M. C., & Blangero, J. (1997). Serum leptin levels are independently correlated with two measures of HDL. *Atherosclerosis*, 132, 237-243.

Ramasamy, S., Boissonneault, G. A., Decker, E. A., & Hennig, B. (1991). Linoleic acid-induced endothelial cell injury: role of membrane-bound enzyme activities and lipid oxidation. *J.Biochem.Toxicol.*, 6, 29-35.

Ramos, P., Martin-Hidalgo, A., & Herrera, E. (1999). Insulin-induced up-regulation of lipoprotein lipase messenger ribonucleic acid and activity in mammary gland. *Endocrinology*, 140, 1089-1093.

Rana, J. S., Li, T. Y., Manson, J. E., & Hu, F. B. (2007). Adiposity compared with physical inactivity and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 30, 53-58.

Rana, J. S., Nieuwdorp, M., Jukema, J. W., & Kastelein, J. J. (2007). Cardiovascular metabolic syndrome - an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Obes.Metab*, 9, 218-232.

Ranganathan, G., Kaakaji, R., & Kern, P. A. (1999). Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J.Biol.Chem.*, 274, 9122-9127.

Ranganathan, G., Li, C., & 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., Vu, D., & Kern, P. A. (1997). Translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves a trans-acting binding protein interacting with the 3' untranslated region. *J.Biol.Chem.*, 272, 2515-2519.

Rask-Madsen, C. & King, G. L. (2007). Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab*, 3, 46-56.

- Rask-Madsen, C. & King, G. L. (2005). Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, 487-496.
- Raso, G. M., Pacilio, M., Esposito, E., Coppola, A., Di, C. R., & Meli, R. (2002). Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. *Br.J.Pharmacol.*, 137, 799-804.
- Rauramaa, R., Kuusela, P., & Hietanen, E. (1980). Adipose, muscle and lung tissue lipoprotein lipase activities in young streptozotocin treated rats. *Horm.Metab Res.*, 12, 591-595.
- Reaven, G. M., Lithell, H., & Landsberg, L. (1996). Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N.Engl.J.Med.*, 334, 374-381.
- Reifenberg, K., Lehr, H. A., Baskal, D., Wiese, E., Schaefer, S. C., Black, S. et al. (2005). Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, 1641-1646.
- Reiterer, G., Toborek, M., & Hennig, B. (2004). Quercetin protects against linoleic acid-induced porcine endothelial cell dysfunction. *J.Nutr.*, 134, 771-775.



Renier, G., Desfaits, A. C., Lambert, A., & 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., & Serri, O. (2000). Effect of gliclazide on monocyte-endothelium interactions in diabetes. *J.Diabetes Complications*, *14*, 215-223.

Renier, G., Skamene, E., DeSanctis, J. B., & 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.

Resnick, H. E. & Howard, B. V. (2002). Diabetes and cardiovascular disease. *Annu.Rev.Med.*, *53*, 245-267.

Rexrode, K. M., Buring, J. E., & Manson, J. E. (2001). Abdominal and total adiposity and risk of coronary heart disease in men. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, *25*, 1047-1056.

Ribau, J. C., Hadcock, S. J., Teoh, K., DeReske, M., & Richardson, M. (1999). Endothelial adhesion molecule expression is enhanced in the aorta and internal mammary artery of diabetic patients. *J.Surg.Res.*, *85*, 225-233.

Richardson, P. D., Davies, M. J., & Born, G. V. (1989). Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet*, 2, 941-944.

Ridker, P. M., Brown, N. J., Vaughan, D. E., Harrison, D. G., & Mehta, J. L. (2004). Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*, 109, IV6-19.

Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., & 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., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., & Hennekens, C. H. (1998). Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*, 97, 425-428.

Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., & Rifai, N. (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N.Engl.J.Med.*, 342, 836-843.

Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E., & 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., Rifai, N., Stampfer, M. J., & Hennekens, C. H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, *101*, 1767-1772.

Ridker, P. M., Stampfer, M. J., & Rifai, N. (2001). Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*, *285*, 2481-2485.

Rifai, N. & Ridker, P. M. (2002). Inflammatory markers and coronary heart disease. *Curr.Opin.Lipidol.*, *13*, 383-389.

Rinker, K. D., Kirkpatrick, A. P., Ting-Beall, H. P., Shepherd, R. D., Levin, J. D., Irick, J. et al. (2004). Linoleic acid increases monocyte deformation and adhesion to endothelium. *Atherosclerosis*, *177*, 275-285.

Rinninger, F., Kaiser, T., Mann, W. A., Meyer, N., Greten, H., & Beisiegel, U. (1998). Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. *J.Lipid Res.*, *39*, 1335-1348.

Rip, J., Nierman, M. C., Ross, C. J., Jukema, J. W., Hayden, M. R., Kastelein, J. J. et al. (2006a). Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 1236-1245.

Rip, J., Nierman, M. C., Wareham, N. J., Luben, R., Bingham, S. A., Day, N. E. et al. (2006b). Serum lipoprotein lipase concentration and risk for future coronary artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 637-642.

Roberts, C. K., Barnard, R. J., Liang, K. H., & 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, D. S. (1963). Changes in the lipolytic activity of the guinea pig mammary gland at parturition. *J. Lipid Res.*, 4, 21-23.

Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Hofer, A., Landau, B. R. et al. (2000). Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes*, 49, 701-707.

Rodriguez-Moran, M. & Guerrero-Romero, F. (1999). Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects. *J. Diabetes Complications*, 13, 211-215.

Rose-John, S. & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem.J.*, 300 ( Pt 2), 281-290.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.*, 340, 115-126.

Rossetti, L. (2000). Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology*, 141, 1922-1925.

Rubins, H. B., Robins, S. J., Collins, D., Fye, C. L., Anderson, J. W., Elam, M. B. et al. (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N.Engl.J.Med.*, 341, 410-418.

Saffari, B., Ong, J. M., & Kern, P. A. (1992). Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats. *J.Lipid Res.*, 33, 241-249.

Sakurai, K. & Sawamura, T. (2003). Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J.Pharmacol.Sci.*, 91, 182-186.

Sano, T., Umeda, F., Hashimoto, T., Nawata, H., & Utsumi, H. (1998). Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, *41*, 1355-1360.

Santomauro, A. T., Boden, G., Silva, M. E., Rocha, D. M., Santos, R. F., Ursich, M. J. et al. (1999). Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*, *48*, 1836-1841.

Santos-Alvarez, J., Goberna, R., & Sanchez-Margalet, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol.*, *194*, 6-11.

Saraswathi, V., Wu, G., Toborek, M., & Hennig, B. (2004). Linoleic acid-induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. *J.Lipid Res.*, *45*, 794-804.

Sartippour, M. R., Lambert, A., Laframboise, M., St-Jacques, P., & Renier, G. (1998). Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes*, *47*, 431-438.

Sartippour, M. R. & Renier, G. (2000). Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: role of peripheral factors. *Diabetes*, 49, 597-602.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y. et al. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 386, 73-77.

Saxena, U., Klein, M. G., & Goldberg, I. J. (1991). Identification and characterization of the endothelial cell surface lipoprotein lipase receptor. *J.Biol.Chem.*, 266, 17516-17521.

Saxena, U., Witte, L. D., & Goldberg, I. J. (1989). Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J.Biol.Chem.*, 264, 4349-4355.

Schachinger, V., Britten, M. B., & Zeiher, A. M. (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 101, 1899-1906.

Schafer, K., Halle, M., Goeschen, C., Dellas, C., Pynn, M., Loskutoff, D. J. et al. (2004). Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 24, 112-117.

Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Sharrett, A. R., Lindberg, G., Savage, P. J., Offenbacher, S. et al. (1999). Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*, 353, 1649-1652.

Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Vigo, A., Pankow, J. S., Couper, D., Ballantyne, C. M. et al. (2006). Leptin and incident type 2 diabetes: risk or protection? *Diabetologia*, 49, 2086-2096.

Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Fruchart, J. C., Tailleux, A., Fievet, C., & 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. et al. (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.

Schulze, M. B., Liu, S., Rimm, E. B., Manson, J. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2004). Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am.J.Clin.Nutr.*, 80, 348-356.



Schwartz, C. J., Valente, A. J., Sprague, E. A., Kelley, J. L., & Nerem, R. M. (1991). The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin.Cardiol.*, *14*, 11-16.

Schwedler, S. B., Amann, K., Wernicke, K., Krebs, A., Nauck, M., Wanner, C. et al. (2005). Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, *112*, 1016-1023.

Schwedler, S. B., Kuhlencordt, P. J., Ponnuswamy, P. P., Hatiboglu, G., Quaschnig, T., Widder, J. et al. (2007). Native C-reactive protein induces endothelial dysfunction in ApoE<sup>-/-</sup> mice: implications for iNOS and reactive oxygen species. *Atherosclerosis*, *195*, e76-e84.

Seip, R. L., Angelopoulos, T. J., & Semenkovich, C. F. (1995). Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. *Am.J.Physiol*, *268*, E229-E236.

Semenkovich, C. F., Wims, M., Noe, L., Etienne, J., & 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.

Sendak, R. A. & Bensadoun, A. (1998). Identification of a heparin-binding domain in the distal carboxyl-terminal region of lipoprotein lipase by site-directed mutagenesis. *J.Lipid Res.*, 39, 1310-1315.

Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Furlanetto, R. W. et al. (2003). Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, 278, 13740-13746.

Serri, O., Li, L., Maingrette, F., Jaffry, N., & 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.

Sever, P. S., Poulter, N. R., Dahlof, B., Wedel, H., Collins, R., Beevers, G. et al. (2005). Reduction in cardiovascular events with atorvastatin in 2,532 patients with type 2 diabetes: Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--lipid-lowering arm (ASCOT-LLA). *Diabetes Care*, 28, 1151-1157.

Shah, P. K. (2003). Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 41, 15S-22S.

Shamsuzzaman, A. S., Winnicki, M., Wolk, R., Svatikova, A., Phillips, B. G., Davison, D. E. et al. (2004). Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation*, *109*, 2181-2185.

Shen, J., Sakaida, I., Uchida, K., Terai, S., & Okita, K. (2005). Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci.*, *77*, 1502-1515.

Shi, X., Niimi, S., Ohtani, T., & Machida, S. (2001). Characterization of residues and sequences of the carbohydrate recognition domain required for cell surface localization and ligand binding of human lectin-like oxidized LDL receptor. *J. Cell Sci.*, *114*, 1273-1282.

Shih, D. M., Xia, Y. R., Wang, X. P., Miller, E., Castellani, L. W., Subbanagounder, G. et al. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, *275*, 17527-17535.

Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M. Y., Trieu, F., Lee, Y. et al. (1997). Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *94*, 4637-4641.

Shimada, M., Ishibashi, S., Inaba, T., Yagyu, H., Harada, K., Osuga, J. I. et al. (1996). Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 7242-7246.

Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. et al. (2001). LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J.Immunol.*, 166, 5108-5114.

Shin, H. J., Oh, J., Kang, S. M., Lee, J. H., Shin, M. J., Hwang, K. C. et al. (2005). Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 329, 18-24.

Shoelson, S. E., Herrero, L., & Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132, 2169-2180.

Shrive, A. K., Cheetham, G. M., Holden, D., Myles, D. A., Turnell, W. G., Volanakis, J. E. et al. (1996). Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat.Struct.Biol.*, 3, 346-354.

Shyy, Y. J., Hsieh, H. J., Usami, S., & Chien, S. (1994). Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91, 4678-4682.

Sierra-Honigmann, M. R., Nath, A. K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C. et al. (1998). Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281, 1683-1686.

Silver, D. L., Jiang, X. C., & Tall, A. R. (1999). Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover. *J.Biol.Chem.*, 274, 4140-4146.

Silver, D. L., Wang, N., & Tall, A. R. (2000). Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J.Clin.Invest*, 105, 151-159.

Simsolo, R. B., Ong, J. M., & 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., & 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, P., Hoffmann, M., Wolk, R., Shamsuzzaman, A. S., & Somers, V. K. (2007). Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 27, e302-e307.

Singh, U., Devaraj, S., Dasu, M. R., Ciobanu, D., Reusch, J., & Jialal, I. (2006). C-reactive protein decreases interleukin-10 secretion in activated human monocyte-derived macrophages via inhibition of cyclic AMP production.

*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 2469-2475.

Singhal, A., Farooqi, I. S., Cole, T. J., O'Rahilly, S., Fewtrell, M., Kattenhorn, M. et al. (2002). Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation*, 106, 1919-1924.

Slim, R., Hammock, B. D., Toborek, M., Robertson, L. W., Newman, J. W., Morisseau, C. H. et al. (2001). The role of methyl-linoleic acid epoxide and diol metabolites in the amplified toxicity of linoleic acid and polychlorinated biphenyls to vascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 171, 184-193.

Smirnova, I. V., Kajstura, M., Sawamura, T., & Goligorsky, M. S. (2004). Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 287, H782-H790.

Snijder, M. B., Heine, R. J., Seidell, J. C., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D., Nijpels, G. et al. (2006). Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study.

*Diabetes Care*, 29, 2498-2503.

So, W. Y., Ng, M. C., Lee, S. C., Sanke, T., Lee, H. K., & Chan, J. C. (2000).

Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Hong.Kong.Med.J.*, 6, 69-76.

Soderberg, S., Ahren, B., Stegmayr, B., Johnson, O., Wiklund, P. G., Weinehall, L.

et al. (1999a). Leptin is a risk marker for first-ever hemorrhagic stroke in a population-based cohort. *Stroke*, 30, 328-337.

Soderberg, S., Olsson, T., Eliasson, M., Johnson, O., & Ahren, B. (1999b). Plasma

leptin levels are associated with abnormal fibrinolysis in men and postmenopausal women. *J.Intern.Med.*, 245, 533-543.

Soderberg, S., Stegmayr, B., Stenlund, H., Sjostrom, L. G., Agren, A., Johansson,

L. et al. (2004). Leptin, but not adiponectin, predicts stroke in males. *J.Intern.Med.*, 256, 128-136.

Solano, M. P. & Goldberg, R. B. (2006). Management of dyslipidemia in diabetes.

*Cardiol.Rev.*, 14, 125-135.

Solfrizzi, V., Panza, F., Colacicco, A. M., Capurso, C., D'Introno, A., Torres, F. et al.

(2002). Relation of lipoprotein(a) as coronary risk factor to type 2 diabetes mellitus and low-density lipoprotein cholesterol in patients > or =65 years of age (The Italian Longitudinal Study on Aging). *Am.J.Cardiol.*, 89, 825-829.

Spector, A. A. (1975). Fatty acid binding to plasma albumin. *J.Lipid Res.*, *16*, 165-179.

Spooner, P. M., Chernick, S. S., Garrison, M. M., & Scow, R. O. (1979a). Development of lipoprotein lipase activity and accumulation of triacylglycerol in differentiating 3T3-L1 adipocytes. Effects of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha, 1-methyl-3-isobutylxanthine, prolactin, and insulin. *J.Biol.Chem.*, *254*, 1305-1311.

Spooner, P. M., Chernick, S. S., Garrison, M. M., & Scow, R. O. (1979b). Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J.Biol.Chem.*, *254*, 10021-10029.

Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H. et al. (2003). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, *361*, 226-228.

Staessen, J., Amery, A., & Fagard, R. (1990). Isolated systolic hypertension in the elderly. *J.Hypertens.*, *8*, 393-405.

Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J. D., & Wentworth, D. (1993). Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, *16*, 434-444.



Stary, H. C. (2000). Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20, 1177-1178.

Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr. et al. (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.

Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J.Biol.Chem.*, 272, 20963-20966.

Steinberg, G. R. (2007). Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle*, 6, 888-894.

Stejskal, D., Ruzicka, V., Adamovska, S., Jurakova, R., Proskova, J., Jedelsky, L. et al. (2003). Adiponectin concentrations as a criterion of metabolic control in persons with type 2 diabetes mellitus? *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.*, 147, 167-172.

Stephenson, K., Tunstead, J., Tsai, A., Gordon, R., Henderson, S., & Dansky, H. M. (2003). Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, 2027-2033.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M. et al. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, *409*, 307-312.

Strauss, J. G., Frank, S., Kratky, D., Hammerle, G., Hrzenjak, A., Knipping, G. et al. (2001). Adenovirus-mediated rescue of lipoprotein lipase-deficient mice. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins is essential for high density lipoprotein maturation in mice. *J.Biol.Chem.*, *276*, 36083-36090.

Sun, Y., Liu, S., Ferguson, S., Wang, L., Klepcyk, P., Yun, J. S. et al. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J.Biol.Chem.*, *277*, 23301-23307.

Sunayama, S., Watanabe, Y., Ohmura, H., Sawano, M., Shimada, K., Mokuno, H. et al. (1999). Effects of troglitazone on atherogenic lipoprotein phenotype in coronary patients with insulin resistance. *Atherosclerosis*, *146*, 187-193.

Sundell, J., Huupponen, R., Raitakari, O. T., Nuutila, P., & Knuuti, J. (2003). High serum leptin is associated with attenuated coronary vasoreactivity. *Obes.Res.*, *11*, 776-782.

Suwaidi, J. A., Hamasaki, S., Higano, S. T., Nishimura, R. A., Holmes, D. R., Jr., & Lerman, A. (2000). Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, *101*, 948-954.

Swan, H. J. (1999). The Framingham Offspring Study: a commentary. 1980. *J.Am.Coll.Cardiol.*, *33*, 1136-1140.

Szmitko, P. E., Wang, C. H., Weisel, R. D., de, A., Jr., Anderson, T. J., & Verma, S. (2003). New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*, *108*, 1917-1923.

Taher, M. M., Garcia, J. G., & Natarajan, V. (1993). Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch.Biochem.Biophys.*, *303*, 260-266.

Takahashi, K., Totsune, K., Sone, M., Kikuchi, K., & Murakami, O. (2005). Effects of adipokines on expression of adrenomedullin and endothelin-1 in cultured vascular endothelial cells. *Peptides*, *26*, 845-851.

Takahashi, S. & 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.

Taleb, S., Herbin, O., it-Oufella, H., Verreth, W., Gourdy, P., Barateau, V. et al. (2007). Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 27, 2691-2698.

Tan, K. C., Chow, W. S., Tam, S., Bucala, R., & Betteridge, J. (2004). Association between acute-phase reactants and advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27, 223-228.

Tanne, D., Benderly, M., Goldbourt, U., Boyko, V., Brunner, D., Graff, E. et al. (2001). A prospective study of plasma fibrinogen levels and the risk of stroke among participants in the bezafibrate infarction prevention study. *Am.J.Med.*, 111, 457-463.

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., & Kraemer, F. B. (1992). Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J.Clin.Invest*, 90, 1672-1678.

Tengku-Muhammad, T. S., Cryer, A., & 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., & 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., & Ramji, D. P. (1999). Synergism between lipopolysaccharide and interferon gamma in the regulation of lipoprotein lipase in macrophages. *Cytokine*, 11, 408-415.

Tennent, G. A., Hutchinson, W. L., Kahan, M. C., Hirschfield, G. M., Gallimore, J. R., Lewin, J. et al. (2008). Transgenic human CRP is not pro-atherogenic, pro-atherothrombotic or pro-inflammatory in apoE(-/-) mice. *Atherosclerosis*, 196, 248-255.

Terrettaz, J., Cusin, I., Etienne, J., & Jeanrenaud, B. (1994). In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, 18, 9-15.

- Teruel, T., Hernandez, R., Rial, E., Martin-Hidalgo, A., & Lorenzo, M. (2005). Rosiglitazone up-regulates lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase and uncoupling protein-1, and down-regulates insulin-induced fatty acid synthase gene expression in brown adipocytes of Wistar rats. *Diabetologia*, *48*, 1180-1188.
- Thogersen, A. M., Soderberg, S., Jansson, J. H., Dahlen, G., Boman, K., Nilsson, T. K. et al. (2004). Interactions between fibrinolysis, lipoproteins and leptin related to a first myocardial infarction. *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.*, *11*, 33-40.
- Thompson, S. G., Kienast, J., Pyke, S. D., Haverkate, F., & van de Loo, J. C. (1995). Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N.Engl.J.Med.*, *332*, 635-641.
- Thorand, B., Kolb, H., Baumert, J., Koenig, W., Chambless, L., Meisinger, C. et al. (2005). Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002. *Diabetes*, *54*, 2932-2938.
- Thorand, B., Lowel, H., Schneider, A., Kolb, H., Meisinger, C., Frohlich, M. et al. (2003). C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998. *Arch.Intern.Med.*, *163*, 93-99.

Tiong, A. Y. & Brieger, D. (2005). Inflammation and coronary artery disease.

*Am.Heart J.*, 150, 11-18.

Toborek, M., Barger, S. W., Mattson, M. P., Barve, S., McClain, C. J., & Hennig, B.

(1996). Linoleic acid and TNF-alpha cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J.Lipid Res.*, 37, 123-135.

Toborek, M., Blanc, E. M., Kaiser, S., Mattson, M. P., & Hennig, B. (1997). Linoleic

acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis, and apoptosis of cultured vascular endothelial cells. *J.Lipid Res.*, 38, 2155-2167.

Toborek, M. & Hennig, B. (1998). The role of linoleic acid in endothelial cell gene

expression. Relationship to atherosclerosis. *Subcell.Biochem.*, 30, 415-436.

Toborek, M., Lee, Y. W., Garrido, R., Kaiser, S., & Hennig, B. (2002). Unsaturated

fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am.J.Clin.Nutr.*, 75, 119-125.

Toruner, F., Akbay, E., Cakir, N., Sancak, B., Elbeg, S., Taneri, F. et al. (2004).

Effects of PPARgamma and PPARalpha agonists on serum leptin levels in diet-induced obese rats. *Horm.Metab Res.*, 36, 226-230.

Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D. E., Frohlich, M., Koenig, W.,

Waltenberger, J. et al. (1998). C-reactive protein frequently colocalizes with the

terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 18, 1386-1392.

Toyoshima, Y., Gavrilova, O., Yakar, S., Jou, W., Pack, S., Asghar, Z. et al. (2005). Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. *Endocrinology*, 146, 4024-4035.

Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A. et al. (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*, 52, 2882-2887.

Tsao, T. S., Stenbit, A. E., Factor, S. M., Chen, W., Rossetti, L., & Charron, M. J. (1999). Prevention of insulin resistance and diabetes in mice heterozygous for GLUT4 ablation by transgenic complementation of GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes*, 48, 775-782.

Turpeinen, A. M., Basu, S., & Mutanen, M. (1998). A high linoleic acid diet increases oxidative stress in vivo and affects nitric oxide metabolism in humans. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, 59, 229-233.

Tuttle, K. R., Bakris, G. L., Toto, R. D., McGill, J. B., Hu, K., & Anderson, P. W. (2005). The effect of ruboxistaurin on nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28, 2686-2690.



Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., & Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, *389*, 610-614.

Uzun, H., Zengin, K., Taskin, M., Aydin, S., Simsek, G., & Dariyerli, N. (2004). Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes.Surg.*, *14*, 659-665.

van Bockxmeer, F. M., Liu, Q., Mamotte, C., Burke, V., & Taylor, R. (2001). Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. *Atherosclerosis*, *157*, 123-129.

van Dam, R. M., Willett, W. C., Manson, J. E., & Hu, F. B. (2006). Coffee, caffeine, and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study in younger and middle-aged U.S. women. *Diabetes Care*, *29*, 398-403.

van Dielen, F. M., van't, V. C., Schols, A. M., Soeters, P. B., Buurman, W. A., & Greve, J. W. (2001). Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, *25*, 1759-1766.

Van, E. M., Zimmermann, R., Groot, P. H., Zechner, R., & Van Berkel, T. J. (2000). Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20, E53-E62.

Van, H. M. & Zilvermit, D. B. (1990). Postprandial lipemia and lipoprotein lipase in the rabbit are modified by olive and coconut oil. *Arteriosclerosis*, 10, 421-429.

van, T. H., Roussel, A., Lalouel, J. M., & Cambillau, C. (1994). Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J.Biol.Chem.*, 269, 4626-4633.

Vaughan, D. E. (2005). PAI-1 and atherothrombosis. *J.Thromb.Haemost.*, 3, 1879-1883.

Veerababu, G., Tang, J., Hoffman, R. T., Daniels, M. C., Hebert, L. F., Jr., Crook, E. D. et al. (2000). Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes*, 49, 2070-2078.

Ventre, J., Doebber, T., Wu, M., MacNaul, K., Stevens, K., Pasparakis, M. et al. (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes*, 46, 1526-1531.

Verma, S., Buchanan, M. R., & Anderson, T. J. (2003). Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation, 108*, 2054-2059.

Verma, S., Li, S. H., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Li, R. K. et al. (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. et al. (2002b). A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation, 106*, 913-919.

Verreth, W., De, K. D., Pelat, M., Verhamme, P., Ganame, J., Bielicki, J. K. et al. (2004). Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation, 110*, 3259-3269.

Viswanathan, S., Hammock, B. D., Newman, J. W., Meerarani, P., Toborek, M., & Hennig, B. (2003). Involvement of CYP 2C9 in mediating the proinflammatory effects of linoleic acid in vascular endothelial cells. *J.Am.Coll.Nutr., 22*, 502-510.

Vita, J. A., Brennan, M. L., Gokce, N., Mann, S. A., Goormastic, M., Shishehbor, M. H. et al. (2004). Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation*, *110*, 1134-1139.

Vlassara, H. & Palace, M. R. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *J.Intern.Med.*, *251*, 87-101.

von, E. A., Schulte, H., Cullen, P., & Assmann, G. (2001). Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J.Am.Coll.Cardiol.*, *37*, 434-439.

Vojarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P. A., Bogardus, C., & Pratley, R. E. (2001). Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes.Res.*, *9*, 414-417.

Wald, D. S., Law, M., & Morris, J. K. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*, *325*, 1202.

Wallace, A. M., McMahon, A. D., Packard, C. J., Kelly, A., Shepherd, J., Gaw, A. et al. (2001). Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*, *104*, 3052-3056.

Wallaschofski, H., Kobsar, A., Sokolova, O., Siegemund, A., Stepan, H., Faber, R. et al. (2004). Differences in platelet activation by prolactin and leptin. *Horm. Metab Res.*, 36, 453-457.

Wallenius, V., Wallenius, K., Ahren, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S. L. et al. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.*, 8, 75-79.

Wang, C. S., Hartsuck, J., & McConathy, W. J. (1992). Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1123, 1-17.

Wang, J., Xian, X., Huang, W., Chen, L., Wu, L., Zhu, Y. et al. (2007). Expression of LPL in endothelial-intact artery results in lipid deposition and vascular cell adhesion molecule-1 upregulation in both LPL and ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27, 197-203.

Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z. J., Pankow, J. S., & Eckfeldt, J. H. (2003). Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 91-98.

Wang, X., Liao, D., Bharadwaj, U., Li, M., Yao, Q., & Chen, C. (2008). C-reactive protein inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28, 519-526.

Wang, X. L., Zhang, L., Youker, K., Zhang, M. X., Wang, J., LeMaire, S. A. et al. (2006). Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*, *55*, 2301-2310.

Weinstock, P. H., Levak-Frank, S., Hudgins, L. C., Radner, H., Friedman, J. M., Zechner, R. et al. (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.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest*, *112*, 1796-1808.

Werner, N. & Nickenig, G. (2006). Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J.Cell Mol.Med.*, *10*, 318-332.

Werstuck, G. H., Lentz, S. R., Dayal, S., Hossain, G. S., Sood, S. K., Shi, Y. Y. et al. (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J.Clin.Invest*, *107*, 1263-1273.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R. E. et al. (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., & 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.

Wick, G., Berger, P., Jansen-Durr, P., & Grubeck-Loebenstien, B. (2003). A Darwinian-evolutionary concept of age-related diseases. *Exp.Gerontol.*, *38*, 13-25.

Wilson, K., Fry, G. L., Chappell, D. A., Sigmund, C. D., & 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.

Winkler, F. K., D'Arcy, A., & Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, *343*, 771-774.

Winnicki, M., Somers, V. K., Accurso, V., Phillips, B. G., Puato, M., Palatini, P. et al. (2002). Fish-rich diet, leptin, and body mass. *Circulation*, *106*, 289-291.

- Winters, B., Mo, Z., Brooks-Asplund, E., Kim, S., Shoukas, A., Li, D. et al. (2000). Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lep(ob)) mice. *J.Appl.Physiol*, 89, 2382-2390.
- Wittrup, H. H., Tybjaerg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G. (1999). Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation*, 99, 2901-2907.
- Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Widomska, S., Ksiazek, M., & Beltowski, J. (2008). Role of extracellular signal-regulated kinases (ERK) in leptin-induced hypertension. *Life Sci.*, 82, 402-412.
- Wolf, G., Hamann, A., Han, D. C., Helmchen, U., Thaiss, F., Ziyadeh, F. N. et al. (1999). Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int.*, 56, 860-872.
- Wolff, S. P., Jiang, Z. Y., & Hunt, J. V. (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic.Biol.Med.*, 10, 339-352.
- Worthley, S. G., Osende, J. I., Helft, G., Badimon, J. J., & Fuster, V. (2001). Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt.Sinai J.Med.*, 68, 167-181.



- Wu, K. K., Aleksic, N., Ballantyne, C. M., Ahn, C., Juneja, H., & Boerwinkle, E. (2003). Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation*, *107*, 1729-1732.
- Wu, X., Wang, J., Fan, J., Chen, M., Chen, L., Huang, W. et al. (2006). Localized vessel expression of lipoprotein lipase in rabbits leads to rapid lipid deposition in the balloon-injured arterial wall. *Atherosclerosis*, *187*, 65-73.
- Xie, L., Chang, L., Guan, Y., & Wang, X. (2005). C-reactive protein augments interleukin-8 secretion in human peripheral blood monocytes. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, *46*, 690-696.
- Xu, F. P., Chen, M. S., Wang, Y. Z., Yi, Q., Lin, S. B., Chen, A. F. et al. (2004). Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation*, *110*, 1269-1275.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J. et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest*, *112*, 1821-1830.
- Yagy, H., Ishibashi, S., Chen, Z., Osuga, J., Okazaki, M., Perrey, S. et al. (1999). Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J.Lipid Res.*, *40*, 1677-1685.

Yam, D., Eliraz, A., & Berry, E. M. (1996). Diet and disease--the Israeli paradox: possible dangers of a high omega-6 polyunsaturated fatty acid diet. *Isr.J.Med.Sci.*, 32, 1134-1143.

Yamagishi, S. I., Edelstein, D., Du, X. L., Kaneda, Y., Guzman, M., & Brownlee, M. (2001). Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J.Biol.Chem.*, 276, 25096-25100.

Yang, T., Pang, C. P., Tsang, M. W., Lam, C. W., Poon, P. M., Chan, L. Y. et al. (2003). Pathogenic mutations of the lipoprotein lipase gene in Chinese patients with hypertriglyceridemic type 2 diabetes. *Hum.Mutat.*, 21, 453.

Yang, W. S. & Deeb, S. S. (1998). Sp1 and Sp3 transactivate the human lipoprotein lipase gene promoter through binding to a CT element: synergy with the sterol regulatory element binding protein and reduced transactivation of a naturally occurring promoter variant. *J.Lipid Res.*, 39, 2054-2064.

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2001). Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am.J.Pathol.*, 158, 1039-1051.

Yates, T., Khunti, K., Bull, F., Gorely, T., & Davies, M. J. (2007). The role of physical activity in the management of impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabetologia*, *50*, 1116-1126.

Yeh, E. T. & Willerson, J. T. (2003). Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*, *107*, 370-371.

Yildiz, B. O. & Haznedaroglu, I. C. (2006). Rethinking leptin and insulin action: therapeutic opportunities for diabetes. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, *38*, 820-830.

Yin, W. & Tsutsumi, K. (2003). Lipoprotein lipase activator NO-1886. *Cardiovasc.Drug Rev.*, *21*, 133-142.

Yla-Herttuala, S., Lipton, B. A., Rosenfeld, M. E., Goldberg, I. J., Steinberg, D., & Witztum, J. L. (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.

Yoshida, H., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D., & Quehenberger, O. (1998). Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem.J.*, *334 ( Pt 1)*, 9-13.

Young, V. M., Toborek, M., Yang, F., McClain, C. J., & Hennig, B. (1998). Effect of linoleic acid on endothelial cell inflammatory mediators. *Metabolism*, *47*, 566-572.

Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J., & Coppel, 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.

Yusuf, S., Gerstein, H., Hoogwerf, B., Pogue, J., Bosch, J., Wolffenbuttel, B. H. et al. (2001). Ramipril and the development of diabetes. *JAMA*, *286*, 1882-1885.

Yusuf, S., Ostergren, J. B., Gerstein, H. C., Pfeffer, M. A., Swedberg, K., Granger, C. B. et al. (2005). Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation*, *112*, 48-53.

Zderic, T. W. & Hamilton, M. T. (2006). Physical inactivity amplifies the sensitivity of skeletal muscle to the lipid-induced downregulation of lipoprotein lipase activity. *J. Appl. Physiol*, *100*, 249-257.

Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Gyori, G. et al. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes. (Lond)*, *31*, 1420-1428.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

Zhang, Y., Repa, J. J., Gauthier, K., & Mangelsdorf, D. J. (2001). Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J.Biol.Chem.*, 276, 43018-43024.

Zhao, S. P. & Wu, Z. H. (2005). Atorvastatin reduces serum leptin concentration in hypercholesterolemic rabbits. *Clin.Chim.Acta*, 360, 133-140.

Zhao, T., Hou, M., Xia, M., Wang, Q., Zhu, H., Xiao, Y. et al. (2005). Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor-alpha expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cell Immunol.*, 238, 19-30.

Zhao, Y. F., Feng, D. D., & Chen, C. (2006). Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 38, 804-819.

Zhong, Y., Li, S. H., Liu, S. M., Szmítko, P. E., He, X. Q., Fedak, P. W. et al. (2006). C-Reactive protein upregulates receptor for advanced glycation end products expression in human endothelial cells. *Hypertension*, 48, 504-511.

Zilversmit, D. B. (1995). Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin.Chem.*, *41*, 153-158.

Zouki, C., Haas, B., Chan, J. S., Potempa, L. A., & Filep, J. G. (2001). Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion. *J.Immunol.*, *167*, 5355-5361.

Zwaka, T. P., Hombach, V., & Torzewski, J. (2001). C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, *103*, 1194-1197.

Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group (1998a). *BMJ*, *317*, 713-720.

Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis (2002). *JAMA*, *288*, 2015-2022.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus (2006). *Diabetes Care*, *29 Suppl 1*, S43-S48.

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 (1998b). *Lancet*, 352, 837-853.