

Université de Montréal

Effets du gliclazide  
sur la fonction du monocyte/macrophage  
et de la cellule endothéliale  
chez les patients diabétiques

par

Anne-Cécile Desfaits

Département de nutrition

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en nutrition

Mars 1998

©Anne-Cécile Desfaits, 1998



QU  
145  
U58  
1998  
V.002

Université de Montréal

Effets du glaucome  
sur la fonction du monoxyde d'azote  
et de la cellule endothéliale  
chez les patients diabétiques

par

Yves-Claude Desjardins

Département de médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Médecin (M.D.)  
en médecine

Mars 1998



Yves-Claude Desjardins 1998

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

“Effets du gliclazide sur la fonction du monocyte/macrophage  
et de la cellule endothéliale chez les patients diabétiques”

présentée par:

Anne-Cécile Desfaits

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Émile Lévy  
Geneviève Renier  
Dominique Garrel  
Louise Brissette

Thèse acceptée le: 03.03.1998

## SOMMAIRE

Le diabète de type 2 est associé à une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires et à un développement précoce de l'athérosclérose. Plusieurs anomalies, dont l'oxydation des lipoprotéines, la glycosylation non enzymatique et l'activation excessive de la fonction monocyttaire/macrophagique semblent jouer un rôle majeur dans la progression de l'athérosclérose associée au diabète de type 2.

Dans le traitement du diabète de type 2, le gliclazide, une sulfonylurée de seconde génération est largement utilisée. Outre son action hypoglycémiante, le gliclazide possède des propriétés de piègeur de radicaux libres. Cependant, le rôle du gliclazide dans les anomalies associées au diabète n'est pas connu. Nous avons donc étudié, à l'aide d'un modèle *ex vivo* et d'un modèle *in vivo*, les anomalies associées au diabète de type 2 et les effets du gliclazide sur ces anomalies. L'étude *ex vivo* fut menée chez 8 patients avec un diabète de type 2 mal contrôlé et traités avec du glyburide (une autre sulfonylurée), et chez 8 sujets normaux. Au début de l'étude, le glyburide a été remplacé par une dose hypoglycémiante équivalente de gliclazide. Les monocytes et le sérum ont été isolés à partir du sang des sujets contrôles et des patients diabétiques avant et après 3 mois de traitement avec le gliclazide. Nos résultats mettent en évidence qu'un traitement à court terme avec le gliclazide permet chez des patients diabétiques de 1) normaliser les niveaux élevés des produits de la peroxydation lipidique et d'adhésion spontanée des monocytes aux cellules endothéliales et de 2) diminuer l'augmentation de la production *in vitro* du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  par les monocytes activés.



Dans notre étude *in vitro*, nous avons examiné les effets du gliclazide sur l'oxydation des lipoprotéines de faible densité médiée par le cuivre, les monocytes et les cellules endothéliales, et sur l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales en culture, induite par l'oxydation des lipoprotéines. Nos résultats mettent en évidence que le gliclazide 1) inhibe de façon spécifique l'oxydation des lipoprotéines médiée par le cuivre et les cellules et 2) diminue l'adhésion des monocytes humains aux cellules endothéliales en culture, induite par des lipoprotéines oxydées. Dans un second volet de notre étude *in vitro*, nous avons également démontré que l'albumine glycosylée augmente l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales par stimulation de l'expression protéique et génique de molécules d'adhésion endothéliales et par augmentation de l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Le prétraitement des cellules endothéliales avec le gliclazide diminue l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales induite par l'albumine glycosylée par diminution de l'expression des molécules d'adhésion, et de l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

En conclusion, nous avons démontré que le gliclazide possède des propriétés anti-oxydantes et inhibitrices sur l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire. Les phénomènes d'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire et d'oxydation des lipoprotéines jouant un rôle majeur dans le développement des complications vasculaires liées au diabète de type 2, le traitement de ces patients avec le gliclazide pourrait être bénéfique dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose, associée au diabète de type 2.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire .....	iii
Liste des figures .....	x
Liste des tableaux .....	xii
Liste des abréviations .....	xiii
Dédicace .....	xv
Remerciements .....	xvi
I. Introduction .....	1
I.1 Définition et classification du diabète mellitus .....	2
I.1.1 Le diabète de type 2 .....	2
I.1.2 Susceptibilité génétique .....	3
I.1.3 Résistance à l'insuline .....	5
I.1.4 Résistance à l'insuline et risque de diabète de type 2 .....	7
I.1.5 Réponse de la cellule $\beta$ à l'insulino-résistance .....	9
I.1.6 Rôle des anomalies de la cellule $\beta$ dans l'évolution du diabète de type 2 .....	10
I.1.7 Anomalies métaboliques: dyslipidémies .....	11
I.1.8 Glucotoxicité: effet de l'hyperglycémie chronique .....	16
I.1.8.1 La voie des polyols .....	17
I.1.8.2 La protéine kinase C .....	18
I.1.8.3 La glycosylation non enzymatique .....	19

I.2 Les complications du diabète .....	20
I.2.1 Complications microvasculaires .....	20
I.2.1.1 Rétinopathie diabétique .....	21
I.2.1.2 Néphropathie diabétique .....	21
I.2.1.3 Neuropathie diabétique .....	23
I.2.2 Complications macrovasculaires .....	24
I.3 Diabète, lipides et athérosclérose .....	26
I.3.1 Athérosclérose .....	26
I.3.1.1 Définition .....	26
I.3.1.2 Pathologie .....	27
I.3.1.3 Pathogenèse .....	28
I.3.1.4 Facteurs de risque .....	31
I.3.2 Facteurs physiopathologiques de l'athérosclérose accélérée dans le diabète .....	33
I.3.2.1 Oxydation des lipoprotéines .....	33
I.3.2.1.1 Processus d'oxydation .....	34
I.3.2.1.2 Mécanismes d'oxydation .....	35
I.3.2.1.3 Propriétés athérogéniques des LDL oxydées .....	38
I.3.2.2 Adhésion des monocytes .....	40
I.3.2.2.1 Molécules d'adhésion .....	41
- La superfamille des immunoglobulines .....	41
- La famille des sélectines .....	44
- La famille des intégrines .....	47

I.3.2.2.2 Adhésion des monocytes aux cellules endothéliales . . . . .	48
I.3.2.2.3 Adhésion et diabète . . . . .	51
I.3.2.3 Glycosylation non enzymatique . . . . .	53
I.3.2.3.1 Propriétés et conséquences fonctionnelles des AGE . . . . .	55
I.3.2.3.2 AGE et adhésion . . . . .	58
I.3.2.4 Facteurs de croissance et fonction monocyttaire . . . . .	59
I.4 Traitements du diabète de type 2 . . . . .	62
I.4.1 Diète et exercice . . . . .	62
I.4.2 Les hypoglycémiantes oraux . . . . .	62
I.4.1.1 Le gliclazide . . . . .	64
I.4.1.2 Propriétés vasculaires . . . . .	65
I.4.3 Insuline . . . . .	66
I.5 Hypothèse de travail . . . . .	68
II. Résultats . . . . .	69
II.1 Premier article: . . . . .	70
“Gliclazide decreases cell-mediated low density lipoprotein (LDL) oxidation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidatively modified LDL.”	
II.2 Deuxième article: . . . . .	101
“Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion and tumor necrosis factor alpha production in NIDDM patients following gliclazide treatment.”	

II.3 Troisième article: . . . . .	130
“Gliclazide reduces the induction of human monocyte adhesion to endothelial cells by advanced glycation end products.”	
III. Discussion . . . . .	163
III.1 Anomalies contribuant au développement de l’athérosclérose dans le diabète de type 2 . . . . .	164
III.1.1 Métabolisme lipidique . . . . .	164
III.1.2 Fonction endothéliale et phénomènes d’adhésion . . . . .	165
III.1.3 Fonction immunitaire . . . . .	167
III.1.4 Fonction plaquettaire . . . . .	169
III.2 Impact du traitement du diabète de type 2 sur le développement des maladies cardio-vasculaires . . . . .	169
III.3 Effets du gliclazide sur certaines anomalies impliquées dans le développement des maladies cardio-vasculaires chez le sujet diabétique .	172
III.3.1 Phénomènes d’oxydation . . . . .	172
III.3.1.1 Étude <i>ex vivo</i> . . . . .	172
III.3.1.2 Étude <i>in vitro</i> . . . . .	173
III.3.2 Adhésion des monocytes aux cellules endothéliales . . . . .	178
III.3.2.1 Étude <i>ex vivo</i> . . . . .	178
III.3.2.2 Étude <i>in vitro</i> . . . . .	180
III.3.3 Cytokines et facteurs de croissance . . . . .	185

IV. Conclusions et perspectives .....	188
IV.1 Conclusions .....	189
IV.2 Perspectives .....	190
V. Références .....	192

## LISTE DES FIGURES

### Introduction:

Figure 1: Signalisation intracellulaire potentielle de l'insuline .....	6a
Figure 2: Mécanismes impliqués dans l'athérogenèse .....	29
Figure 3a: Famille des intégrines et des immunoglobulines .....	43
Figure 3b: Famille des sélectines .....	45
Figure 4: Rôle possible des AGE dans les évènements pathologiques associés aux complications diabétiques .....	56
Figure 5: Formule chimique du gliclazide .....	65

### Premier article:

Figure 1a: "Electrophoretic mobility of human normolipidemic plasma, native LDL and copper ion-treated LDL .....	90
Figure 1b: "Effect of gliclazide on LDL oxidation in a cell-free system" .....	90
Figure 2: "Effect of gliclazide on monocyte LDL oxidation" .....	91
Figure 3: "Effect of gliclazide on endothelial cell LDL oxidation" .....	92
Figure 4: "Effect of gliclazide on monocyte adhesion to endothelial cells" ...	93

### Deuxième article:

Figure 1: "Monocyte adhesion in NIDDM patients" .....	126
Figure 2: "Serum levels of cell adhesion molecules" .....	127
Figure 3a: "Basal monocyte cytokines production" .....	128
Figure 3b: "LPS-stimulated monocyte cytokines production" .....	128

Figure 4a: “Basal monocyte TNF $\alpha$ production” .....	129
Figure 4b: “LPS-stimulated monocyte TNF $\alpha$ production” .....	129
Troisième article:	
Figure 1a: “Effect of AGE-BSA on human monocyte adhesion to HUVECs” .	155
Figure 1b: “Effects of mAb against cell adhesion molecules” .....	155
Figures 2a et 2b: “Effects of AGE-BSA on soluble cell adhesion molecule” ..	156
Figures 3a et 3b: “Effects of AGE-BSA on cell-associated expression of adhesion molecules” .....	157
Figure 4: “Effect of AGE-BSA on cell adhesion molecules mRNA levels. Modulatory effect of gliclazide” .....	158
Figure 5: “Effect of AGE-BSA on NF- $\kappa$ B activation. Inhibitory effect of gliclazide” .....	159
Figure 6: “Effect of gliclazide on AGE-induced monocyte adhesion” .....	160
Figures 7a et 7b: “Effect of gliclazide on AGE-stimulated levels of soluble cell adhesion molecules” .....	161
Figures 8a et 8b: “Effect of gliclazide on AGE-induced cell-associated adhesion molecules expression” .....	162



**LISTE DES TABLEAUX**

## Introduction:

Tableau I: Effets biologiques proathérogéniques des LDL oxydées .....	39
---	----

## Premier article:

Tableau I: "Generation of TBARS by copper ions, monocytes and BAE cells" .	87
--	----

Tableau II: "Effect of glyburide on the generation of TBARS by copper ions, monocytes and BAE cells" .....	88
---	----

Tableau III: "Monocyte adhesion to bovine aortic endothelial cells" .....	89
---	----

## Deuxième article:

Tableau I: "Serum concentrations of lipid peroxides" .....	124
--	-----

Tableau II: "Serum levels of cytokines and growth factors" .....	125
--	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: acide désoxyribonucléique
AGE	: “advanced glycation end products”, produits terminaux de glycosylation
AGPI	: acide gras polyinsaturé
CAM	: “cell adhesion molecule”, molécule d’adhésion cellulaire
CETP	: Protéine de transfert des esters de cholestérol
DAG	: diacylglycérol
DID	: diabète insulino-dépendant
DNID	: diabète non insulino-dépendant
EGF	: “epidermal growth factor”, facteur de croissance épidermique
ELAM-1	: E-Sélectine
FGF	: “fibroblast growth factor”, facteur de croissance des fibroblastes
HbA1c	: hémoglobine glycosylée
HDL	: “high density lipoprotein”, lipoprotéine de haute densité
HyperTG	: hypertriglycéridémie
ICAM-1	: “intercellular cell adhesion molecule”, molécule d’adhésion intercellulaire-1
IGF-1	: “insulin-like growth factor”, facteur de croissance ressemblant à l’insuline
INF $\gamma$	: interféron $\gamma$
IL-1 $\beta$	: interleukine-1 $\beta$
IL-4	: interleukine-4
IL-6	: interleukine-6
IL-8	: interleukine-8

IRS1	: “insulin receptor substrate 1”, substrat primaire du récepteur à l’insuline
LCAT	: Lécithine:cholestérol acyltransférase
LDL	: “low-density lipoprotein”, lipoprotéine de faible densité
LPS	: lipopolysaccharide
LO	: lipoxygénase
MAP	: “mitogen-activated protein”, protéine activée par les mitogènes
MCP-1	: protéine chémoattractrice des monocytes
M-CSF	: “macrophage-colony stimulating factor”, facteur stimulant les macrophages
MPO	: myéloperoxydase
PDGF $\beta$	: “platelet-derived growth factor”, facteur de croissance dérivé des plaquettes
PKC	: protéine kinase C
SH2, SH3	: domaine homologue Src
SMC	: “smooth muscle cell”, cellule musculaire lisse
TBARS	: substances réagissant avec l’acide thiobarbiturique
TGF $\beta$	: “transforming growth factor”, facteur de croissance transformant
TG	: triglycérides
TNF $\alpha$	: “tumor necrosis factor”, facteur de nécrose tumorale- $\alpha$
VCAM-1	: “vascular cell adhesion molecule”, molécule d’adhésion vasculaire-1
VLDL	: “very low-density lipoprotein”, lipoprotéine de très faible densité

*A mes parents*

*A ma famille,*

*A mes amis,*

## REMERCIEMENTS

À ma directrice de thèse, le docteur Geneviève Renier, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour l'enthousiasme qu'elle a toujours manifesté à l'égard de mes recherches.

À mon co-directeur de thèse, le docteur Omar Serri, pour sa compétence et pour ses judicieux conseils apportés tout le long de la thèse.

À Anick Lambert, pour sa grande disponibilité et sa gentillesse durant toutes ces années de thèse.

À Fernanda Janeiro, pour son efficacité et sa patience dans la mise en forme des manuscrits et de cette thèse.

Mes remerciements vont enfin à tous ceux qui nous ont aidé, de près ou de loin, à concrétiser ce travail.

---

## **I. INTRODUCTION**

## **I.1 Définition et classification du diabète mellitus**

### **I.1.1 Le diabète de type 2**

Le diabète mellitus est un syndrome caractérisé par une hyperglycémie chronique ou par des niveaux de glucose plasmatique au dessus des limites définies lors du test de tolérance au glucose. Le diabète mellitus peut être de 2 types. Tout d'abord, le diabète de type 1 ou insulino-dépendant (DID) s'accompagne d'une déficience complète en insuline, et les patients diabétiques, généralement des adolescents au moment de l'apparition du syndrome, ne peuvent pas survivre sans un apport exogène d'insuline. Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) se caractérise par un défaut d'insulinosécrétion par le pancréas, une augmentation de la production de glucose en période postprandiale et une diminution de l'utilisation du glucose en réponse à l'insuline des tissus périphériques et en particulier des muscles squelettiques (Girard, 1994). De plus, le DNID est associé à des altérations du métabolisme des protéines et des lipides (Nathan, 1996). Les complications spécifiques à long terme du diabète mellitus incluent la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. Tous les patients avec un diabète de type 1 ou de type 2 de durée suffisante sont vulnérables à ces complications qui peuvent causer une morbidité sérieuse (Nathan, 1993). Les complications tardives du diabète se manifestent par une variété de signes cliniques, impliquant la paroi artérielle des gros vaisseaux (macroangiopathie) et des petits vaisseaux (microangiopathie) ainsi que le système nerveux périphérique (neuropathie).

La prévalence du diabète mellitus, très élevée dans les pays industrialisés, a été estimée à plus de 6% de la population américaine, toutes races et tout âge confondus (ADA, 1996). De plus, chez la moitié des patients atteints de diabète, la maladie n'a pas encore été

diagnostiquée. Le DNID représente 90 à 95% des cas diagnostiqués du diabète, et 100% des cas non diagnostiqués. Enfin, la prévalence du diabète augmente avec l'âge, et les femmes semblent plus touchées que les hommes, pour un âge donné. Les personnes atteintes de diabète ont une espérance de vie amoindrie et une qualité de vie altérée. En effet, le diabète est une des principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés (ADA, 1996).

### **I.1.2 Susceptibilité génétique**

Le DNID est une maladie multifactorielle qui résulte de l'interaction de facteurs innés (susceptibilité génétique) et acquis (environnement). Ces facteurs sont à l'origine d'anomalies métaboliques classées en 2 groupes principaux: des anomalies de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, et des anomalies de l'action de l'insuline sur ses tissus cibles (ou insulino-résistance) (Guillausseau et Lubetzki, 1996).

Des études menées à partir de paires de jumeaux homozygotes ont démontré le rôle fondamental de la susceptibilité génétique dans le développement du DNID. En effet, si un jumeau est atteint de DNID, le risque que son frère développe la maladie est voisin de 95%, alors qu'il n'est tout au plus que de 35% dans le DID (Barnett et al, 1981). Cependant, en dépit de ces données, le mode de transmission du DNID est resté longtemps méconnu. Une variété particulière de DNID, le MODY ("Maturity Onset type Diabetes in the Youth") a facilité les études génétiques car ce type de diabète se transmet selon un mode autosomique dominant et se caractérise par un début précoce vers 25 ans (Fajans, 1990). Trois variétés



génétiqes de MODY sont actuellement identifiées, et comportent des mutations sur différents gènes dont celui de la glucokinase qui contrôle la réponse insulino-sécrétoire au glucose, et intervient dans la captation hépatique du glucose. Les patients présentant des mutations de ce gène ont une élévation du seuil glycémique à partir duquel se déclenche la sécrétion d'insuline, alors que leur insulino-sensibilité est normale (revue par Guillausseau et Lubetzki, 1996).

L'association dans certaines familles du DNID à des mutations portant sur des gènes impliqués dans l'insulino-sécrétion (gènes de l'insuline ou de la pro-insuline) ou dans l'action périphérique de l'insuline (gène du récepteur de l'insuline ou de la glycogène synthase) a été mise en évidence. A chaque fois, l'anomalie est très rare et pourrait rendre compte tout au plus de 1% de tous les DNID. Des études épidémiologiques ont montré que le risque pour un individu de développer un DNID était plus élevé si sa mère plutôt que son père avait un DNID (Guillausseau et Lubetzki, 1996; Thomas et al, 1994).

Certaines de ces mutations, pour s'exprimer cliniquement, exigent un environnement particulier et c'est malencontreusement celui des sociétés industrialisées occidentales. Ainsi, un manque d'activité physique soutenue et régulière et une alimentation trop riche en calories sont en cause, avec des aliments trop raffinés et pauvres en fibres, des lipides en abondance comportant des acides gras saturés en quantité importante (Guillausseau et Lubetzki, 1996).

### **I.1.3 Résistance à l'insuline**

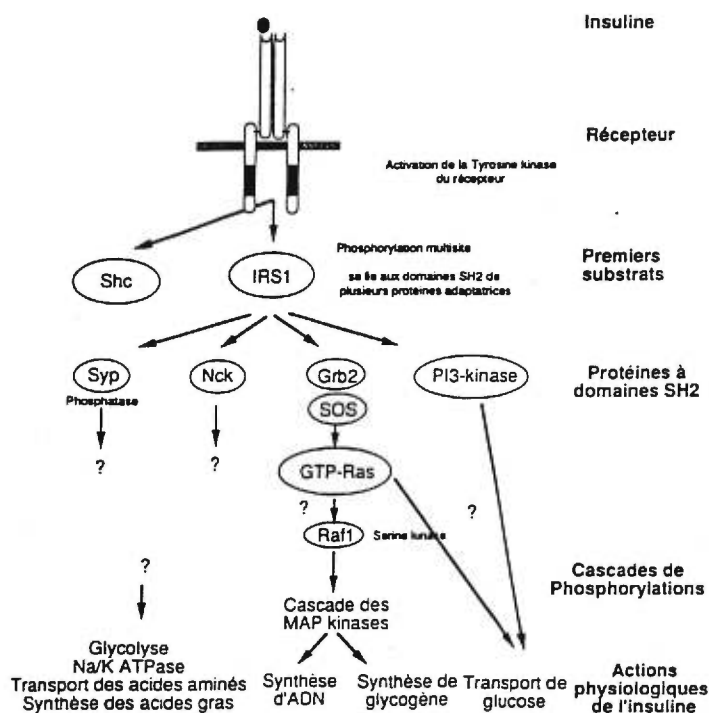
Une des anomalies majeures du DNID, mise à part le défaut de sécrétion de l'insuline, et l'hyperproduction de glucose hépatique, est la diminution des effets de l'insuline (ou insulino-résistance) sur ses tissus cibles, notamment les muscles squelettiques. Un état de résistance à l'insuline a été clairement mis en évidence chez les patients atteints de DNID, en utilisant des techniques variées, et en particulier le clamp euglycémique hyperinsulinémique (De Fronzo et al, 1992). Les études de dose-réponse à l'insuline ont montré que chez les patients atteints de DNID, la production hépatique de glucose était moins freinée et l'utilisation périphérique de glucose moins stimulée en réponse à l'insuline (De Fronzo et al, 1992). Ces résultats indiquent que le foie et les tissus périphériques sont impliqués dans la résistance à l'insuline. Plus de 80% du glucose est utilisé dans les tissus périphériques lors du clamp euglycémique hyperinsulinémique chez l'homme non diabétique (De Fronzo et al, 1992). Bien que l'insuline stimule l'utilisation de glucose par le tissu adipeux, les muscles squelettiques sont considérés comme le site majeur des effets de l'insuline lors du clamp euglycémique hyperinsulinémique (De Fronzo et al, 1992). Chez les patients atteints de DNID, la captation musculaire du glucose est réduite de 40 à 50% et rend compte de la quasi-totalité de la résistance à l'insuline. De plus, les mesures de calorimétrie indirecte ont permis d'établir que 30% du glucose était oxydé et 70% était stocké durant un clamp euglycémique hyperinsulinémique (De Fronzo et al, 1992). Le stockage sous forme de glycogène dans les muscles est donc considéré comme la voie métabolique prédominante lors des clamps euglycémiques chez le sujet non diabétique. Au

contraire, chez les sujets NID, l'augmentation du stockage et de l'oxydation du glucose est réduite de 40 à 50% (De Fronzo et al, 1992).

Les études réalisées *in vivo* ont permis de bien identifier les principaux tissus (le foie et les muscles) et les principales voies métaboliques (la gluconéogenèse, la synthèse de glycogène et l'oxydation du glucose) responsables de l'insulinorésistance chez les patients atteints de DNID. Néanmoins, ces études ne permettent pas de savoir si ces défauts résultent de l'altération du transport transcapillaire de l'insuline, d'anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles ou des inter-relations entre le métabolisme du glucose et celui des acides gras. Elles ne permettent pas non plus d'identifier les étapes cellulaires altérées, comme entre autres, le nombre et le fonctionnement des récepteurs à l'insuline, le transport du glucose ou les enzymes impliquées dans la synthèse du glycogène (Girard, 1994).

Les niveaux relativement élevés d'insuline existant dans le DNID peuvent être la conséquence de la diminution du nombre de récepteurs à l'insuline à la surface des adipocytes et des cellules musculaires. L'insuline ne pouvant plus favoriser la captation de glucose par ces cellules, il en résulte une hyperglycémie chronique qui stimule encore plus la sécrétion de l'insuline, conduisant à une hyperinsulinémie encore plus marquée (Fontbonne, 1996). La résistance à l'insuline des patients atteints d'un DNID semble également être localisée à une étape post-récepteur (Koltermann et al, 1981). Après la liaison à la sous-unité  $\alpha$  de son récepteur membranaire, l'insuline induit une série de phosphorylations sur des tyrosines qui aboutit à l'acquisition par la sous-unité  $\beta$  d'une activité tyrosine kinase, lui permettant de phosphoryler des protéines intracellulaires, par interaction avec la protéine IRS1 ("Insulin Receptor Substrate 1"), un substrat primaire qui possède de nombreux sites de phosphorylation (Clauser et al, 1995). Il existe également des substrats

secondaires qui interagissent avec IRS-1. Ces cascades d'interactions protéiques aboutissent à l'activation d'enzymes variées et de systèmes enzymatiques comme celui des MAP kinases et elles sont schématisées dans la **figure 1**.



**Figure 1.** Représentation schématique de la signalisation intracellulaire potentielle de l'insuline médiée par l'activation de la tyrosine kinase du récepteur et par la phosphorylation de IRS1. IRS1, substrat primaire du récepteur à l'insuline; SH2 et SH3, domaine homologue Src; MAP, "Mitogen-Activated Protein" (Adapté de Clauser et al, 1995).

Chez les sujets non diabétiques, il existe une excellente corrélation entre l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline et la captation de glucose par les tissus. Par contre, la plupart des études montrent une diminution de l'activité de la tyrosine kinase du récepteur de l'insuline dans le tissu adipeux, le muscle et le foie des patients atteints de DNID. De plus, la phosphorylation de la protéine IRS1, le substrat endogène majeur du récepteur à l'insuline, est diminuée dans les adipocytes de sujets atteints de DNID (Thies et al, 1990).

Un autre défaut est généralement associé à la résistance à l'insuline, c'est celui du stockage et de l'oxydation du glucose dans le muscle. Cette anomalie peut résulter théoriquement de trois causes: le transport membranaire du glucose, la synthèse de glycogène et l'oxydation du glucose (Girard, 1994). Dans le DNID, l'insulinorésistance est tout d'abord liée à une diminution du transport du glucose dans le muscle stimulé par l'insuline. Ce défaut se traduit par une diminution de la translocation du glucose par ses transporteurs spécifiques (GLUT 4) localisés dans les membranes intracellulaires, vers la membrane plasmique, et par une diminution de l'activité fonctionnelle de ces transporteurs (Kahn, 1996). La résistance à l'insuline est également associée à une anomalie de l'activation de la glycogène synthase, responsable de la synthèse de glycogène dans le muscle. Enfin, chez les diabétiques NID, il existe une diminution des effets de l'insuline sur l'oxydation musculaire du glucose associée à une diminution de l'activité de la pyruvate déshydrogénase qui catalyse la réaction (Kelley et al, 1992).

Des mutations dans le gène du récepteur à l'insuline sont également responsables de la résistance à l'insuline chez un nombre limité de personnes, mais les bases moléculaires de l'insulinorésistance de la plupart des patients atteints d'un DNID demeurent inconnues (Polonsky et al, 1996).

#### **I.1.4 Résistance à l'insuline et risque de diabète de type 2**

L'existence conjointe d'une résistance à l'insuline et d'une altération génétique de la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas semble être le mécanisme de base pour le développement du DNID (Gerich, 1996). La résistance à l'insuline est clairement un

important facteur de risque pour le DNID. Une étude (Martin et al, 1992) portant sur la descendance de 2 parents avec un DNID montre que chez les sujets ayant une résistance à l'insuline, le risque de développer un DNID est augmenté de 80%, sur une période de suivi de 25 ans. De même, l'étude Malmö de prévention du DNID (revue par Beck-Nielsen et al, 1995) a mis en évidence qu'une réponse élevée d'insuline, pendant un test de tolérance au glucose (indiquant une résistance à l'insuline) permettait de prédire un développement de DNID chez des hommes d'âge moyen. Enfin, les travaux menés par le groupe de Ravussin (Lillioja et al, 1993) chez les Indiens Pimas, ont révélé que l'obésité et la résistance à l'insuline (indépendante de l'obésité) étaient des facteurs de prédiction d'un développement de DNID. Ces différentes études indiquent donc clairement que la résistance périphérique à l'insuline est un défaut qui permet de prédire le développement d'un DNID.

Le DNID est plus commun chez les personnes ayant une résistance à l'insuline, cependant, la majorité des personnes insulino-résistantes ne deviennent pas diabétiques. De plus, les personnes qui deviennent diabétiques peuvent avoir eu une résistance à l'insuline pendant plusieurs années sans que leur concentration en glucose plasmatique n'augmente. Les différences physiologiques qui existent entre les personnes avec une insulino-résistance qui développent un diabète et celles qui n'en développent pas, sont importantes pour la compréhension de la physiopathologie du DNID. La cellule  $\beta$  du pancréas semble être une candidate de choix pour expliquer ces différences. En effet, la capacité de la cellule  $\beta$  à produire plus d'insuline pour compenser l'état de résistance à l'insuline va déterminer si les concentrations de glucose plasmatique vont rester normales ou augmenter (Polonsky et al, 1996).

### **I.1.5 Réponse de la cellule $\beta$ à l'insulino-résistance**

Les concentrations en insuline augmentent chez les personnes qui ont une résistance à l'insuline, mais une tolérance au glucose normale. Dans les sociétés industrialisées, la résistance à l'insuline est commune et la principale cause de l'insulino-résistance dans le DNID semble être l'obésité et plus particulièrement l'accumulation de graisses intra-abdominales ainsi que les effets néfastes de l'hyperglycémie (Reaven, 1992; Polonsky et al, 1996). Le taux basal et le taux total de 24 heures de sécrétion de l'insuline sont 3 à 4 fois plus élevés chez les sujets obèses que les sujets contrôles minces. De même, certaines personnes obèses sécrètent 5 à 8 fois plus d'insuline que les personnes normales, ce qui correspond à une quantité de 500 unités d'insuline par 24 heures (revue par Polonsky et al, 1996).

Chez les personnes qui ont une résistance à l'insuline, la diminution de la sensibilité à l'insuline doit être compensée par une augmentation de la sécrétion de l'insuline, pour que les concentrations de glucose restent normales. Quand les cellules  $\beta$  du pancréas ne peuvent plus continuer à hypersécréter de l'insuline, l'insulinorésistance associée à l'hyperinsulinémie compensatrice devient une intolérance au glucose avec une augmentation des concentrations de glucose postprandiales. Il y a alors transition vers le diabète clinique avec une hyperglycémie franche (Polonsky et al, 1996). Les données actuelles ne permettent pas de dire s'il existe une relation de cause à effet entre la résistance à l'insuline et l'incapacité des cellules  $\beta$  à produire de l'insuline chez les personnes prédisposées à développer un DNID, ou alors si ces variables sont indépendantes.

### **I.1.6 Rôle des anomalies de la cellule $\beta$ dans l'évolution du diabète de type 2**

Pour définir le rôle de la cellule  $\beta$  dans le développement du DNID, il est important de déterminer à quel moment la fonction de la cellule  $\beta$  devient anormale dans l'histoire naturelle du DNID. Les études basées sur les modèles animaux comme le rat Zucker ou la souris C57Bl6 ont permis de mettre en évidence les facteurs de la cellule  $\beta$  impliqués dans la progression de l'insulinorésistance vers le diabète (revue par Polonsky et al, 1996). Ainsi, le développement du diabète semble associé à une hyperplasie des îlots de Langerhans, ce qui suggère que la résistance à l'insuline conduit à une augmentation compensatrice de la masse des cellules  $\beta$ . De plus, l'expression de nombreux gènes est profondément altérée dans les îlots des animaux prédiabétiques. L'expression de l'ARN messenger des canaux potassiques et calciques dépendant du voltage, de la glucokinase et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase est notamment diminuée. Par contre, les niveaux d'ARN messenger de la glucose-6-phosphatase et de la 12-lypoxigénase sont augmentés (Polonsky et al, 1996). Ces défauts de la cellule  $\beta$  peuvent être détectés dans les îlots des animaux prédiabétiques, bien avant que l'hyperglycémie ne se développe. Par conséquent, l'altération de l'expression génique primaire et l'échec de l'hyperplasie compensatrice conjointe, semblent être des déterminants majeurs de la décompensation des cellules  $\beta$  et du diabète qui en résulte, dans les modèles animaux (Polonsky et al, 1996).

Les études effectuées chez l'homme ont montré que les anomalies de la sécrétion de l'insuline chez des personnes atteintes d'un DNID franc, incluent une diminution ou une absence du pic de sécrétion précoce de l'insuline en réponse à une charge intraveineuse de glucose. Chez les patients avec un DNID, il n'est pas possible de distinguer les défauts dans



la sécrétion de l'insuline qui sont pathogénétiquement impliqués dans le développement du diabète, de ceux qui sont secondaires à l'hyperglycémie. C'est pourquoi de nombreuses études portent sur des sujets prédiabétiques, où les concentrations de glucose sont normales ou presque (Polonsky et al, 1996).

Les patients ayant une anomalie de tolérance au glucose présentent également une anomalie de la fonction de la cellule  $\beta$  qui se traduit notamment par une diminution du pic précoce de sécrétion de l'insuline après une charge orale de glucose et par une diminution de la capacité des cellules  $\beta$  à compenser la résistance à l'insuline (Byrne et al, 1995). De plus, les cellules  $\beta$  deviennent progressivement insensibles au glucose parallèlement à une diminution de la tolérance au glucose, ce qui conduit au développement d'un diabète franc. Ainsi, la fonction de la cellule  $\beta$  est anormale bien avant le début du diabète, à un stade où la concentration de glucose à jeun est normale, mais anormale après une charge orale de glucose (Polonsky et al, 1996).

### **I.1.7 Anomalies métaboliques: dyslipidémies**

Quelques études ont suggéré que la résistance à l'insuline pouvait être à l'origine d'une dyslipidémie (Revue par Garg, 1996). Les dyslipidémies se caractérisent par des niveaux élevés de cholestérol et/ou de triglycérides (TG) et elles peuvent avoir deux origines, primaires ou secondaires. Dans le premier cas, aucun agent causal n'est à l'origine de la dyslipidémie, celle-ci peut être de type familial (génétique) ou de type sporadique (non génétique). Les dyslipidémies secondaires ont un agent causal qui peut être entre autres, le

diabète sucré, l'hypertension ou l'insuffisance rénale. Les dyslipidémies peuvent être classées en 6 types selon les anomalies constatées dans les lipoprotéines (Monnier et al, 1991):

- Le type I se caractérise par une hypertriglycéridémie (hyperTG) importante et un niveau de cholestérol plasmatique légèrement élevé. L'anomalie lipoprotéique consiste en une augmentation des quantités de chylomicrons (chylomicronémie) qui transportent les TG exogènes. Cette hyperlipidémie est rare, et résulte d'une déficience génétique de la lipoprotéine lipase.

- Le type II se divise en deux composantes a et b. La dyslipidémie de type IIa se caractérise par des niveaux de TG normaux et une augmentation des niveaux de cholestérol contenu dans les lipoprotéines de faible densité (LDL-cholestérol). Le type IIb comprend l'hypercholestérolémie de type IIa, plus une hyperTG modérée par augmentation du contenu en lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Le type IIa est le plus souvent un désordre génétique dominant, alors que le type IIb est habituellement acquis, par exemple par une diète riche en lipides.

- Le type III, quant à lui, est caractérisé par une hyperTG et une hypercholestérolémie causées par une augmentation des VLDL et de ses résidus (lipoprotéines de densité intermédiaire), ainsi qu'une augmentation des résidus de chylomicrons. Cette dyslipidémie peu commune, peut être soit une maladie récessive génétique, avec des défauts au niveau de l'apo E, soit être secondaire à des anomalies endocriniennes comme l'hypothyroïdisme (Feldman, 1994).

- Le type IV correspond à une hyperTG légère ou modérée (endogène) avec des niveaux normaux ou légèrement augmentés de cholestérol plasmatique, dus à une augmentation des niveaux de VLDL. Dans ce type IV, il y a également diminution des

niveaux de cholestérol contenus dans les lipoprotéines de haute densité (HDL-cholestérol). Cette dyslipidémie, très commune dans les pays industrialisés, est souvent associée à une obésité intra-abdominale et à une intolérance au glucose, et elle prédispose à l'athérosclérose.

- Le type V enfin, combine une hyperTG très importante (endogène et exogène) et une hypercholestérolémie avec une augmentation des VLDL, des chylomicrons et de leurs résidus. Ce type d'hyperlipidémie plus rare, est en général secondaire à des maladies métaboliques comme le diabète sucré.

Toutes ces dyslipidémies ne sont pas uniquement secondaires au diabète, elles peuvent être primaires (Lopes-Virella et Colwell, 1987). Mais, lorsqu'elles sont causées par le diabète, elle doivent disparaître avec un bon contrôle glycémique. Cependant, certaines dyslipidémies, bien que non directement liées à l'équilibre glycémique, peuvent être en relation avec le diabète sucré par l'intermédiaire d'états morbides ou d'erreurs diététiques associées au diabète. Ainsi, l'obésité et la consommation excessive de calories ou de glucides, fréquemment rencontrées dans le DNID, jouent un rôle dans l'apparition et la persistance d'une hyperlipidémie chez ce type de malade. Dans ce cas, l'amélioration de la dyslipidémie dépend non seulement d'un bon contrôle glycémique, mais également de la correction de l'excès pondéral et des habitudes alimentaires (Monnier et al, 1991).

Une hyperTG diagnostiquée chez un patient atteint de DNID traduit en général une mauvaise compliance des mesures diététiques (régimes hypocaloriques) et la persistance d'un équilibre glycémique imparfait. Dans ce cas, c'est une dyslipidémie de type IV, caractérisée par une production excessive de VLDL par le foie et une altération de leur catabolisme. Les hyperlipidémies de type mixte (type IIb et III), qui associent une augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol et de TG, peuvent être présentes dans le DNID.

En général, cette dyslipidémie est associée à un mauvais contrôle glycémique, le plus souvent entretenu par des erreurs diététiques et par une surcharge pondérale. Dans le DNID avec obésité, l'hyperlipidémie de type mixte est fréquente, et le rétablissement de la normoglycémie est en général insuffisant pour améliorer le profil lipidique. Il faut également une approche nutritionnelle qui consiste à instaurer un régime hypocalorique et à modifier les habitudes alimentaires des patients.

L'anomalie des lipoprotéines la plus communément reconnue chez les patients atteints d'un DNID est l'hyperTG, car ces patients en général, ont un profil normal de cholestérol et d'apolipoprotéines par rapport à la population non diabétique (De Man et al, 1996). Chez beaucoup de diabétiques NID, l'augmentation de la production des VLDL riches en TG, peut être une des conséquences de l'obésité et il est difficile de savoir dans quelle proportion l'hyperTG diabétique est due à l'obésité ou à l'état diabétique lui-même (Abate et al, 1995). Pour Taskinen et al. (1986), l'obésité et le DNID ont des effets additifs pour augmenter les TG. En effet, dans leur étude, l'obésité seule peut augmenter les TG plasmatiques par élévation de la quantité de VLDL sécrétées dans la circulation. Et, si l'obésité est associée avec le diabète, l'hyperTG est plus importante car le diabète contribue à enrichir les VLDL en TG. D'après ces auteurs, l'état diabétique semble donc contribuer de façon indépendante au développement de l'hyperTG. En plus, les particules de VLDL dans le DNID peuvent avoir des anomalies dans leur composition. En effet, elles apparaissent plus grosses et plus enrichies en TG que les VLDL normales. Une augmentation de l'apo E dans les VLDL a également été rapportée (Fielding et al, 1986; Howard et al, 1987).

Mis à part les chylomicrons et les VLDL, d'autres classes de lipoprotéines comme les LDL, peuvent être altérées dans le DNID. La plupart des études montrent que les niveaux de LDL chez les patients diabétiques NID sont similaires à ceux de la population générale non diabétique. Cependant des anomalies dans le métabolisme et la composition des LDL des patients diabétiques ont été rapportées par plusieurs équipes et de plus, ces LDL sont considérées comme étant plus athérogéniques que celles de la population normale (Abate et al, 1995). En effet, ces LDL enrichies en cholestérol, pourraient interférer avec le transport inverse du cholestérol, notamment au niveau du transfert des esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines riches en TG (Howard et Howard, 1994), ce qui en retour favoriserait l'athérosclérose. Les diabétiques de type 2 ont une fréquence plus élevée du phénotype B pour les LDL (Feingold et al, 1992). Cela signifie que la majorité des LDL ont un diamètre  $\leq 25.5$  nm et qu'il y a une prédominance de LDL petites et denses (selon la classification d'Austin et al, 1988). Le mécanisme de formation de ces particules n'est pas encore bien connu, mais ces LDL semblent accompagner de façon caractéristique les niveaux élevés de TG. L'augmentation de la fréquence du phénotype B peut contribuer, même en présence de faibles concentrations de TG à jeun, à une athérosclérose accélérée dans le DNID (Abate et al, 1995). En effet, la réduction de la taille de la particule induit un changement de conformation de l'apo B-100, ce qui affecte son affinité pour le récepteur des LDL. Les LDL denses sont donc moins efficacement épurées de la circulation par les récepteurs hépatiques. Elles ont, de ce fait, une demi-vie prolongée, ce qui les expose davantage à des modifications secondaires essentiellement oxydatives (Dejager et Turpin, 1995).

Une autre anomalie des lipoprotéines dans le DNID, est le niveau peu élevé des lipoprotéines de haute densité, qui accompagne souvent l'augmentation des niveaux de TG. Les niveaux de HDL sont importants car ces lipoprotéines captent le cholestérol libre des cellules et celui-ci est alors estérifié par la lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT). Les esters de cholestérol sont alors transférés aux lipoprotéines riches en TG par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) ou les HDL sont captées directement par le foie (Schaefer, 1991). Dans le DNID, les HDL des patients diabétiques, notamment ceux de la fraction LpA-I (HDL contenant l'apo A-I mais pas l'apo A-II) ont une capacité réduite d'induire le transport inverse du cholestérol, l'activité de la LCAT semble également réduite et le transfert des esters de cholestérol des HDL est inhibé. Mis ensemble, toutes ces anomalies diminuent fortement les propriétés antiathérogéniques des HDL (Howard et Howard, 1994; Cavallero et al, 1995).

La dyslipidémie de type mixte retrouvée fréquemment dans le DNID semble faire partie intégrante du syndrome d'insulinorésistance. En effet, les mêmes anomalies sont retrouvées chez les sujets présentant une résistance à l'insuline et un excès de graisse intra-abdominale, mais qui ne sont pas encore diabétiques.

### **I.1.8 Glucotoxicité: effet de l'hyperglycémie chronique**

Une caractéristique importante du DNID est l'hyperglycémie chronique associée à cette pathologie. Le degré d'hyperglycémie est d'ailleurs la variable la plus étroitement associée au risque de mort par affection cardio-vasculaire, et agit indépendamment des autres facteurs de risque (Capron, 1996). L'hyperglycémie rencontrée chez les patients

diabétiques altère la fonction des cellules endothéliales, notamment en augmentant l'expression des composantes de la membrane basale. La perméabilité de l'endothélium pour les macromolécules peut aussi être affectée et des substances comme les facteurs de croissance vont diffuser et aller stimuler la croissance des cellules musculaires lisses sous-jacentes. Les propriétés adhésives des cellules endothéliales pour les leucocytes et les plaquettes sont également augmentées par l'hyperglycémie qui peut aussi retarder la croissance des cellules endothéliales (revue par Haller et al, 1996).

Des concentrations élevées de glucose ont également des effets néfastes sur la voie des polyols et du diacylglycérol (DAG). De même l'activité de la protéine kinase C (PKC) peut être altérée et la glycosylation non enzymatique des protéines est augmentée (King et al, 1996).

#### **I.1.8.1 La voie des polyols**

L'augmentation de la voie des polyols a été suggérée comme pouvant être un mécanisme responsable des maladies microvasculaires diabétiques. L'aldose réductase catalyse la réduction du glucose en sorbitol. Ensuite, le sorbitol est oxydé en fructose par la polyol déshydrogénase. L'aldose réductase a une faible affinité pour le glucose, et, à des concentrations normales de glucose, trouvées chez les non-diabétiques, le métabolisme du glucose par cette voie constitue un très petit pourcentage de l'utilisation du glucose total. Cependant, pendant des périodes d'hyperglycémie, les niveaux intracellulaires de glucose peuvent atteindre les niveaux extracellulaires dans des cellules qui n'ont pas besoin d'insuline pour la captation du glucose. Dans ces circonstances, le métabolisme du glucose par la voie

des polyols peut compter jusqu'à 33% de l'utilisation du glucose total dans le cristallin de lapin et 11% dans les globules rouges humains. L'activité excessive de la voie des polyols peut être reliée aux autres mécanismes impliqués dans les anomalies vasculaires. Ainsi, l'oxydation du sorbitol amplifie les effets de l'hyperglycémie en favorisant une augmentation de la synthèse *de novo* de DAG et de la glycosylation non enzymatique (Ruderman et al, 1992).

#### **I.1.8.2 La protéine kinase C**

L'hyperglycémie peut également affecter l'activité de la PKC. En effet de fortes concentrations de glucose entraînent une augmentation de la synthèse *de novo* de DAG, qui à son tour va provoquer une augmentation de l'activité de la PKC, au niveau des cellules endothéliales (Ruderman et al, 1992). Dans les cellules vasculaires, l'activation de la PKC module la vitesse de croissance des cellules, la synthèse d'ADN et le taux de renouvellement des récepteurs hormonaux (Walker et Viberti, 1994). La PKC a également un rôle dans la relaxation artérielle. En effet, une augmentation de l'activité de la PKC, associée à l'hyperglycémie, augmente la libération de prostaglandines vasoconstrictrices. Ainsi, la PKC est un médiateur intracellulaire multiple, dont l'activité peut être stimulée par une exposition prolongée à une hyperglycémie, ce qui peut conduire à de nombreuses perturbations cellulaires, réversibles comme des anomalies de perméabilité, de débit et d'épaississement de la membrane basale (King et al, 1996).



### **I.8.1.3 La glycosylation non enzymatique**

A ces mécanismes biochimiques réversibles, il faut ajouter des mécanismes irréversibles comme la formation de produits de glycosylation ("advanced glycosylation end products", AGE). Ces AGE vont s'accumuler lentement sur la matrice extracellulaire et sur d'autres protéines ayant des taux de renouvellement peu élevés. La formation d'AGE sur les composantes de la matrice contribue à l'évolution des complications diabétiques. Par exemple, la modification des domaines de liaison du collagène de type IV, induit une diminution de l'adhésion des cellules endothéliales (Brownlee, 1992).

## **I.2 Les complications du diabète**

Les complications vasculaires du diabète existent dans la micro- et la macrovasculature, impliquant principalement la rétine et le glomérule rénal ainsi que le système cardio-vasculaire. Les complications vasculaires représentent la cause principale de morbidité et de mortalité des patients diabétiques. Ces anomalies vasculaires nécessitent 10 à 20 ans, avant de se manifester (King et al, 1996).

### **I.2.1 Complications microvasculaires**

Parmi les complications microvasculaires se retrouvent la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. Les mécanismes pathogéniques postulés pour le développement des microangiopathies sont divisés en trois groupes (Nathan, 1993). Le premier groupe comprend les mécanismes reliés directement au glucose, dont les anomalies dans la voie des polyols (accumulation de sorbitol) et la glycosylation excessive des protéines circulantes et liées aux membranes. Les mécanismes vasculaires font partie du deuxième groupe. Dans cette catégorie, se retrouvent les anomalies présentes dans l'endothélium et les cellules de soutien. Ces cellules de soutien sont composées des péricytes dans la rétine et des cellules mésangiales dans le glomérule rénal. L'hyperfiltration rénale et l'hypertension intrarénale sont également classées dans cette catégorie. Finalement, le troisième groupe réunit des mécanismes divers, dont l'influence génétique et les anomalies de la fonction plaquettaire et des facteurs de croissance. Certains de ces mécanismes s'appliquent seulement à une complication ou à un stade d'une complication (Nathan, 1993).

### **1.2.1.1 Rétinopathie diabétique**

La rétinopathie existe dans tous les types de diabète. L'évaluation clinique requiert un examen ophtalmologique approfondi. Dans les stades initiaux de la rétinopathie non proliférative, des micro-anévrismes provenant des capillaires terminaux de la rétine sont visibles. La fuite des globules rouges de ces micro-anévrismes provoque des hémorragies locales et les vaisseaux de la rétine deviennent de plus en plus perméables permettant la fuite de liquide (Nathan, 1993). Le stade suivant de la rétinopathie proliférative commence quand les vaisseaux sanguins commencent à s'obstruer et qu'une ischémie compromet la couche de fibre nerveuse de la rétine. Des nouveaux vaisseaux se forment alors, ce qui correspond à une néovascularisation à la surface rétinienne. A partir de ce stade, les changements au niveau de la rétine peuvent conduire à une perte totale de la vision (Nathan, 1993). La rétinopathie non proliférative et proliférative sont des lésions caractéristiques de la maladie diabétique. Les patients diabétiques peuvent cependant être sujets à d'autres maladies ophtalmiques, comme la cataracte (Nathan et al, 1986).

### **1.2.1.2 Néphropathie diabétique**

La néphropathie est la complication du diabète qui est associée à la plus forte mortalité (Nathan, 1993). La microalbuminurie est le trait caractéristique de la néphropathie diabétique. Cette maladie est définie par une albuminurie persistante avec un taux d'excrétion d'albumine urinaire supérieure à la normale, qui est de 10 mg par jour maximum, une diminution du taux de filtration glomérulaire et une augmentation de la pression

sanguine (Alzaid, 1996). Dans le diabète, la microalbuminurie consiste en un taux de sécrétion d'albumine urinaire de 20-200  $\mu\text{g}/\text{min}$ , soient 30-300 mg/24 heures. Ce niveau n'est détectable qu'avec des techniques sensibles telle que la radio-immunologie; les autres techniques, moins sensibles, détectent des niveaux d'albumine urinaire d'au moins 250-300 mg/jour, ce qui correspond à une macroalbuminurie ou albuminurie clinique. L'histoire naturelle de la néphropathie diffère entre les deux types de diabète. Dans le DID, la maladie se développe dans environ 35% des cas (incidence cumulative) et les deux tiers de ces patients vont développer une insuffisance rénale. Dans le DNID, la néphropathie est plus rare et son incidence est mal définie, mais la prévalence est estimée entre 3-16% (Decker et al, 1994).

Les anomalies fonctionnelles précoces observées dans la néphropathie diabétique sont la microalbuminurie et l'hyperfiltration glomérulaire. L'état d'hyperfiltration glomérulaire est caractéristique d'un DID nouvellement diagnostiqué. De plus, cet état hyperdynamique peut jouer un rôle critique dans l'initiation et la progression de la glomérulopathie diabétique du DID (Mogensen et Andersen, 1973). De façon similaire, mais moins marquée, des changements hémodynamiques ont été décrits chez des patients ayant un DNID nouvellement diagnostiqué. L'hyperfiltration glomérulaire est associée à une augmentation du débit rénal sanguin, une hypertension des capillaires du glomérule et une augmentation de la surface de filtration. Les glomérules sont hypertrophiés et les reins deviennent plus gros. Ces derniers changements ne sont observés que chez les diabétiques de type 1. Dans les deux types de diabète, le taux de filtration glomérulaire commence à diminuer de façon irréversible quand le taux d'excrétion de l'albumine augmente à

100-300 mg/jour. Ceci est dû à la réduction progressive de la surface de filtration causée par l'expansion des cellules mésangiales. La pression sanguine est normale au début du DID et le reste, en général, chez les patients avec une albuminurie normale. Quand il y a microalbuminurie, la pression commence à augmenter quand le taux d'excrétion d'albumine est supérieur à 50 mg/jour (Deckert et al, 1994). Le stade final de la maladie rénale est caractérisé par des reins atrophiés avec une glomérulosclérose diffuse (Nathan, 1993).

La microalbuminurie est un facteur de prédiction de maladies coronariennes pour les personnes diabétiques NID, qui ont un taux d'excrétion urinaire d'albumine supérieur à la normale. Pour expliquer la relation entre la microalbuminurie et les maladies cardiovasculaires, il faut se rappeler que la microalbuminurie est causée par une perte de la charge négative de la membrane basale glomérulaire, ce qui permet la fuite d'albumine. Par conséquent, des changements similaires pourraient exister ailleurs dans les vaisseaux sanguins, ce qui permettrait aux lipoprotéines athérogènes de pénétrer dans la paroi artérielle. En d'autres mots, l'augmentation de la perte d'albumine urinaire pourrait refléter simplement une manifestation glomérulaire d'un état d'hyperperméabilité vasculaire généralisée qui serait peu visible cliniquement (Deckert et al, 1989).

### **1.2.1.3 Neuropathie diabétique**

La neuropathie diabétique fait référence aux dommages des nerfs périphériques, somatiques ou autosomiques attribuables seulement au diabète. La forme la plus commune de neuropathie diabétique est la neuropathie périphérique, symétrique sensitivo-motrice.

L'évaluation de la neuropathie inclut un examen des sensations douloureuses, des fonctions motrices et des réflexes dans les extrémités supérieures et inférieures. La neuropathie sensitivo-motrice détectable par examen physique comporte des symptômes de paresthésie, une perte de la sensibilité dans les pieds et une modification de l'architecture du pied diabétique, ce qui entraîne des traumatismes au niveau du pied, et des ulcères (Nathan, 1993).

Enfin, une neuropathie au niveau du système autonome peut affecter la motilité gastrique ou intestinale, la fonction de l'estomac, le tonus musculaire ou la fonction cardiaque (Nathan, 1993).

### **I.2.2 Complications macrovasculaires**

Les maladies cardio-vasculaires sont généralement les mêmes chez les patients avec un DNID ou DID et les patients sans diabète. La différence majeure dans les maladies cardio-vasculaires chez les patients diabétiques comparés à des personnes non diabétiques est l'augmentation de la fréquence de ces maladies (Kannel et McGee, 1979). De plus, les maladies coronariennes se développent plus tôt chez les patients diabétiques que chez les non diabétiques (Nathan, 1993).

L'augmentation de la prévalence des maladies cardio-vasculaires dans le DNID est précédée d'un important nombre de facteurs de risque. Les patients atteints d'un DNID sont souvent obèses et ont généralement une dyslipidémie et une hypertension artérielle. Cependant, indépendamment de ces variables, le diabète reste un risque majeur de maladies

coronariennes. Cet effet peut être médié en partie par l'apparition des complications rénales. De plus, l'hyperglycémie chronique peut également être un facteur de risque indépendant, particulièrement chez les femmes (Singer et al, 1992).

### **I.3 Diabète, lipides et athérosclérose**

#### **I.3.1 Athérosclérose**

##### **I.3.1.1 Définition**

L'athérosclérose, complication majeure du DNID, a été décrite il y a déjà plus de 150 ans, mais les pathologistes de l'époque ne savaient pas alors quelle en était la cause. Ils pouvaient seulement en voir les effets sur les artères au cours des autopsies. L'athérosclérose est une lésion anatomique des artères de moyen et de gros calibre, siégeant surtout sur les coronaires, l'aorte et ses branches céphaliques, les artères intestinales, rénales, iliaques, et sur tout le trajet des artères des membres inférieurs.

La lésion athéroscléreuse rend la paroi artérielle dure, scléreuse et parfois calcaire. Elle se caractérise par un dépôt local de lipides essentiellement constitués de cholestérol. Les conséquences de l'athérosclérose sont nombreuses: le calibre de l'artère est rétréci, entraînant une insuffisance circulatoire locale lors d'un effort supplémentaire. La lésion de la paroi artérielle, notamment lors de l'ulcération, favorise l'apparition de caillots sanguins, les thrombus, responsables de l'oblitération plus ou moins complète de la circulation sanguine. L'artère lésée se détériore alors progressivement et très lentement, jusqu'à l'apparition d'un anévrisme. Toutes ces conséquences sont graves, surtout lorsqu'elles touchent les artères du myocarde. Alors que l'athérosclérose se développe très lentement (sur 10, 20, 30 ans ou plus), ces complications sont brutales et peuvent être responsables de mort rapide (Jacotot, 1982).



### I.3.1.2 Pathologie

L'athérosclérose humaine est une maladie chronique qui commence généralement pendant l'enfance et ne se manifeste qu'à l'âge moyen ou plus tard. A son stade précoce, la lésion athéromateuse se caractérise par une accumulation de cellules inflammatoires et de lipides (cholestérol et ester de cholestérol) dans l'espace sous-endothélial. L'accumulation de lipides au sein des macrophages contribue à la formation de cellules spumeuses dont la présence traduit la création des premières lésions athéromateuses identifiables ou stries lipidiques (Jacotot, 1982; Basha et Sowers, 1995).

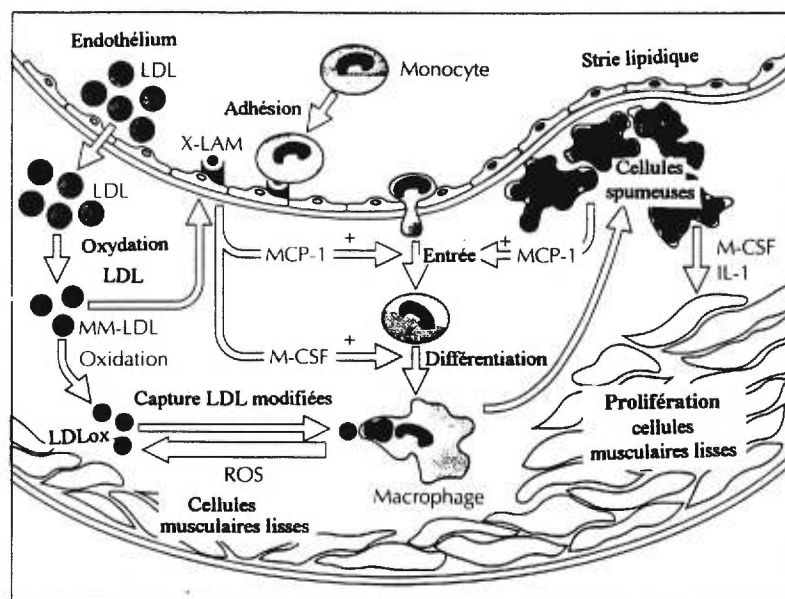
La deuxième phase évolutive est celle de la formation de la plaque fibreuse. A mesure que les macrophages chargés de lipides dans la strie lipidique, repoussent l'endothélium, ils peuvent causer une rupture de cette couche, exposant ainsi les cellules musculaires lisses ("Smooth Muscle Cells", SMC) au sang périphérique. Les plaquettes adhèrent alors rapidement à ces cellules, elles s'agrègent et libèrent le facteur de croissance dérivé des plaquettes ("Platelet-Derived Growth Factor- $\beta$ ", PDGF $\beta$ ) qui va stimuler la prolifération des SMC. Les SMC et les macrophages vont alors synthétiser des fibres de collagène, d'élastine et des protéoglycans, qui s'accumulent dans la substance fondamentale de la plaque. Une plaque fibreuse se compose d'un centre nécrotique, contenant des lipides inclus dans les macrophages et des lipides extracellulaires, recouvert d'une capsule fibreuse. Une plaque fibreuse peut rester relativement stable pendant de nombreuses années. Le degré de rétrécissement du calibre de l'artère causé par une telle plaque dépend de la quantité de lipides déposés dans son centre nécrotique ainsi que des degrés de prolifération des SMC et de formation de tissu conjonctif qui y sont associés (Ross, 1986; Bilato et Crow, 1996).

Enfin, la phase évolutive finale de l'athérosclérose est la formation d'une plaque compliquée, constituée non seulement d'une plaque fibreuse, mais aussi de zones d'hémorragie, de calcification, d'ulcération et de thrombose. Une hémorragie survient fréquemment lorsque la plaque fibreuse déforme sérieusement la structure de la paroi artérielle, entraînant la rupture des petites artéioles nourricières. Le sang ainsi accumulé dans la paroi finit souvent par se calcifier. De plus, des parties de la plaque fibreuse peuvent se fissurer, causant des crevasses ou des ulcères qui exposent les SMC au sang circulant. Il peut alors se produire dans cette région une agrégation des plaquettes et la formation d'un thrombus pouvant causer l'occlusion de l'artère. La probabilité qu'une plaque fibreuse évolue en lésion compliquée est fonction de sa taille et du degré de déformation de la structure de la paroi artérielle (Jacotot, 1982; Ross, 1986; Bilato et Crow, 1996).

### **I.3.1.3 Pathogenèse**

L'athérosclérose est le résultat de nombreuses interactions complexes qui existent au niveau de la paroi artérielle et qui sont résumées dans la **figure 2**. La première étape du développement des stries lipidiques consiste en l'infiltration de lipoprotéines dans la paroi artérielle. Ce processus dépend de la concentration plasmatique en lipoprotéines et semble se produire non pas par endocytose des lipoprotéines par un récepteur, mais plutôt par augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales (Steinberg et al, 1989). Il y a ensuite rétention des lipoprotéines dans la paroi artérielle, dans un système de fibres et fibrilles sécrétées par les cellules de la paroi artérielle (Berliner et al, 1995). Les cellules de la paroi artérielle peuvent sécréter des produits oxydatifs qui vont alors initier l'oxydation

des lipides des LDL emprisonnées dans l'espace sous-endothélial (Parthasarathy et al, 1992; Berliner, 1992).



**Figure 2. Mécanismes impliqués dans l'athérogenèse. IL-1, interleukine-1; MCP-1, protéine chémoattractrice des monocytes; M-CSF, "macrophage-colony stimulating factor"; MM-LDL, LDL minimalement modifiées; LDLox, LDL oxydées; ROS, substances oxygénées réactives; X-LAM, molécules d'adhésion leucocytaire (Adapté de Berliner et al, 1996).**

La modification oxydative des LDL se fait en 2 phases. La première phase s'effectue avant le recrutement des monocytes et résulte en une oxydation de la partie lipidique des LDL avec peu de changements dans l'apo B-100. La seconde phase commence quand les monocytes sont recrutés au niveau de la lésion de l'endothélium, notamment par la protéine chémoattractrice des monocytes ou MCP-1. Les monocytes se différencient ensuite en macrophages, sous l'action du "macrophage-colony stimulating factor" (M-CSF), et possèdent alors une grande capacité oxydante, car ils peuvent libérer des radicaux libres,

initiateurs de la peroxydation lipidique. Dans cette seconde phase, les lipides contenus dans les lipoprotéines sont oxydés plus sévèrement et la partie protéique des LDL est également modifiée, conduisant à la perte de la reconnaissance de la particule par le récepteur classique des LDL. Les particules de LDL sont alors reconnues d'autres récepteurs, incluant le récepteur "scavenger" des macrophages qui reconnaît aussi les LDL acétylées (Sparrow et al, 1989), CD36 qui reconnaît les LDL faiblement oxydées et le récepteur Fcγ qui reconnaît les LDL oxydées, mais pas les LDL acétylées (revue par Penn et al, 1994). La capture des LDL modifiées n'est ensuite plus régulée par le contenu des macrophages en cholestérol, ce qui entraîne une accumulation massive de cholestérol dans les cellules, et la transformation des macrophages en cellules spumeuses.

Les cellules spumeuses sont caractéristiques des stries lipidiques de l'athérosclérose (Berliner et al, 1992). Les LDL oxydées (LDLox) elles-mêmes ont un rôle dans le recrutement et l'adhésion des monocytes, car elles sont capables d'induire la sécrétion de substances chimiotactiques pour les monocytes circulants (Frostegard et al, 1993). Une fois les macrophages présents dans la paroi artérielle, les LDL peuvent s'opposer à leur sortie en inhibant leur mobilité et en favorisant leur différenciation en macrophages tissulaires, ce qui aboutit à leur séquestration et leur accumulation dans l'intima artérielle (Quinn et al, 1987). Ces macrophages deviennent alors capables d'oxyder d'autres LDL. L'entrée des LDL dans la paroi artérielle est par ailleurs facilitée par l'existence de brèches au niveau de l'endothélium vasculaire résultant de l'action cytotoxique des LDLox (Picard, 1996). Cette cytotoxicité peut également entraîner la nécrose des cellules spumeuses, augmentant ainsi le noyau lipidique extracellulaire ce qui est un événement important dans la transition entre la phase de stries lipidiques et celle d'une lésion plus avancée (Schwartz et al, 1993).

De façon concomitante, sous l'action du PDGF $\beta$  (agent chimiotactique), les SMC vont migrer de la média vers l'intima et proliférer, tout en augmentant leur synthèse de collagène (Schwartz et al, 1993). Tous ces événements localisés dans la paroi artérielle contribuent au développement de l'athérosclérose, jusqu'à sa phase finale, la rupture de la plaque athéromateuse.

#### **I.3.1.4 Facteurs de risque**

L'athérosclérose et les maladies cardio-vasculaires restent la cause majeure de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. Quelques facteurs de risque ont été identifiés et associés aux maladies des gros vaisseaux (Kannel et McGee, 1979). Ces facteurs peuvent être scindés en deux groupes: les facteurs de risques modifiables et ceux non modifiables. L'âge, le sexe et l'histoire familiale sont des variables non modifiables. L'incidence des maladies cardio-vasculaires augmente avec l'âge, quelque soit le sexe. Par contre, les femmes avant leur ménopause, développent moins de maladies cardio-vasculaires que les hommes, et cela est attribué à l'effet protecteur des oestrogènes (Durrington, 1993). En effet, les oestrogènes peuvent influencer de façon bénéfique le développement des cellules spumeuses macrophagiques. Ils diminuent la capture des lipoprotéines modifiées par le récepteur "scavenger", stimulent l'hydrolyse des esters de cholestérol et l'efflux subséquent de cholestérol et enfin ils réduisent la sécrétion de pro-oxydants (St Clair, 1997).

Parmi les facteurs de risque modifiables, le niveau élevé de cholestérol plasmatique (cholestérol total de 6,21 mmol/L ou plus) est un facteur de risque majeur, mais pas unique. Des niveaux plasmatiques élevés de LDL-cholestérol (LDL-cholestérol de 4,14

mmoles/L ou plus) et faibles de HDL-cholestérol (HDL-cholestérol de 0,91 mmoles/L ou moins) sont généralement associés à une athérogenèse accélérée car alors, l'infiltration des LDL dans la paroi artérielle est augmentée et le transport inverse du cholestérol est diminué (Steinberg et al, 1989). L'hypertriglycéridémie semble constituer un facteur de risque indépendant, bien que cette notion reste encore très discutée. En général, les niveaux de VLDL sont inversement liés à ceux des HDL et l'hypertriglycéridémie est souvent associée à une hyperinsulinémie qui apparaît comme un facteur de risque indépendant dans l'athérogenèse (Ginsberg, 1991).

La sédentarité, caractéristique des sociétés industrialisées, fait également partie des facteurs de risque (Durrington, 1993), ainsi que le tabagisme, qui peut doubler l'incidence des maladies cardio-vasculaires quand la consommation de tabac excède 20 cigarettes par jour car à ce moment là, l'endothélium vasculaire est souvent lésé (Castelli et al, 1977; Schaefer, 1991).

Le risque d'accidents vasculaires croît également avec l'augmentation de la tension artérielle, tant systolique que diastolique (Kannel et McGee, 1979). L'obésité (excédent de 30% ou plus par rapport au poids idéal), généralement associée à d'autres anomalies comme le diabète ou l'hypertension est aussi considérée comme un facteur de risque. Enfin, le diabète est un facteur de risque majeur pour l'incidence des maladies cardio-vasculaires. La plupart des études indiquent que les patients diabétiques ont un taux de mortalité dû aux maladies cardio-vasculaires de 2 à 4 fois supérieur aux personnes non diabétiques (Eschwege et al, 1994).

### **I.3.2 Facteurs physiopathologiques de l'athérosclérose accélérée dans le diabète**

Dans le DNID, quelques facteurs physiopathologiques pouvant être à l'origine du développement précoce de l'athérosclérose ont été identifiés. Parmi ces facteurs, se trouve le stress oxydatif qui est augmenté dans le DNID et qui se traduit par l'oxydation des lipoprotéines. Des anomalies de la fonction monocyttaire et endothéliale sont également décelables dans le DNID. Ces anomalies se caractérisent par des altérations dans les interactions monocytes-cellules endothéliales et dans la production monocyttaire des cytokines et des facteurs de croissance. Enfin, l'accumulation excessive des produits de la glycosylation non enzymatique a également un rôle dans le développement accéléré de l'athérosclérose dans le DNID.

#### **I.3.2.1 Oxydation des lipoprotéines**

L'oxydation des LDL est augmentée chez les patients diabétiques, non seulement parce que le glucose favorise la formation de radicaux libres en s'auto-oxydant (Wolff et Dean, 1987), mais aussi parce que les concentrations plasmatiques en anti-oxydants comme l'acide ascorbique sont diminuées dans le diabète (Akkus et al, 1996). Les LDL sont également en quantité plus importante dans le plasma des patients diabétiques et restent de façon prolongée au niveau de la paroi artérielle (du fait de la glycosylation de certaines protéines) où elles ont le temps d'y être oxydées (Mullarkey et al, 1990). Ces modifications aboutissent à la "glyco-oxydation" des LDL (Picard, 1996). Ainsi, des concentrations plus élevées de lipoprotéines modifiées sont retrouvées dans le sérum de patients diabétiques

(Stewart et al, 1993). Des études *in vitro* mettent en évidence que la susceptibilité des LDL à l'oxydation augmente en présence de fortes concentrations de glucose (Hunt et al, 1991; Kawamura et al, 1994). Le glucose semble favoriser l'oxydation des LDL, par un mécanisme qui est dépendant de la voie de l'anion superoxyde (Kawamura et al, 1994). L'hypertriglycéridémie généralement associée au DNID, en augmentant la production de l'anion superoxyde par les cellules mononucléées de patients diabétiques pourrait représenter un facteur additionnel favorisant la peroxydation lipidique (Hiramatsu, 1988).

#### **I.3.2.1.1 Processus d'oxydation**

La modification oxydative des lipides *in vivo* semble jouer un rôle central non seulement dans l'athérosclérose et les diverses séquelles vasculaires du diabète, mais aussi dans le processus de vieillissement (Witztum et Steinberg, 1991). Les réactions chimiques se produisant lors de l'oxydation des LDL sont complexes et ont été largement étudiées. L'oxydation des lipoprotéines commence vraisemblablement quand un radical libre réactif soustrait un atome d'hydrogène à un acide gras polyinsaturé (AGPI) à la surface de la particule de LDL. Cette réaction s'accompagne de la consommation des antioxydants endogènes des LDL comme l'ubiquinol, le  $\beta$ -carotène, le lycopène et la vitamine E qui est l'antioxydant le plus abondant (Esterbauer et al, 1992). Les AGPI sont particulièrement sensibles à la peroxydation car les hydrogènes sont plus facilement extraits par les radicaux libres, probablement à cause des liaisons doubles. Des radicaux peroxydes et alkoxydes sont alors formés, et peuvent en retour initier l'oxydation des AGPI avoisinants. En absence d'une concentration suffisante d'antioxydants, la peroxydation lipidique va se propager.



Bien que ce processus débute a priori dans les AGPI présents dans les phospholipides de surface, la réaction s'étend et implique la majeure partie des lipides présents dans le coeur de la particule de LDL.

Les AGPI des phospholipides ne sont pas les seuls impliqués. En effet, les acides gras des esters de cholestérol et des triglycérides le sont aussi. Dans ce processus, la dégradation des AGPI entraîne la formation d'aldéhydes très réactifs (comme le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéal), de cétones et d'autres produits qui peuvent en retour se lier aux résidus lysine de l'apo B des LDL. Ces complexes lipide-lysine changent la charge des LDL, rendant la surface de la protéine de charge négative (Auerbach et al, 1996). L'attaque oxydative entraîne le clivage de l'apo B, exposant de nouveaux épitopes à la surface de la protéine, reconnus par les récepteurs "scavengers" des macrophages (Witztum et Steinberg 1991; Esterbauer et al, 1992; Reaven et Witztum, 1996). Ainsi, toutes ces réactions conduisent à une altération marquée de la structure des LDL.

#### **I.3.2.1.2 Mécanismes d'oxydation**

L'oxydation des LDL *in vivo* ne semble pas exister dans le plasma car les antioxydants solubles dans l'eau et les protéines qui chélatent les ions métalliques y sont présents en grande quantité. De même, les fluides extracellulaires de l'intima artérielle semblent contenir assez d'antioxydants pour prévenir l'oxydation des LDL. Cependant, Juul et al. (1996) ont proposé que des LDL moyennement oxydées pourraient circuler dans le plasma suffisamment longtemps pour entrer, s'accumuler et être dégradées dans la paroi artérielle. Néanmoins, la majorité des études s'accordent pour dire que la modification

oxydative des LDL existerait seulement dans des micro-domaines où les LDL seraient isolées des nombreux antioxydants présents dans le milieu aqueux avoisinant et où elles seraient soumises à un stress oxydatif. La paroi artérielle pourrait représenter un tel environnement et des études *in vitro* ont démontré que les LDL peuvent être oxydées par l'ensemble des cellules de la paroi artérielle soit les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les SMC (Reaven et Witztum, 1996; Berliner et Heinecke, 1996).

*In vitro*, dans un système sans cellules, l'oxydation des LDL est le plus souvent initiée par incubation avec le cuivre ou le fer qui décompose les hydroperoxydes lipidiques existants et initie les réactions de propagation de l'oxydation. Les LDL peuvent également s'auto-oxyder si elles sont stockées pendant plusieurs mois et elles sont alors qualifiées de LDL minimalement modifiées (Esterbauer et al, 1992). Le rôle de ces ions métalliques *in vivo* est incertain et des études cliniques montrent qu'ils ne seraient pas impliqués dans l'oxydation des LDL dans les étapes précoces de l'athérosclérose (Rice-Evans et al, 1996).

Les mécanismes par lesquels les LDL s'oxydent *in vivo* sont peu connus. Plusieurs voies d'oxydation semblent exister, selon le type de cellule de la paroi artérielle impliqué. Tout d'abord, les espèces oxygénées réactives dont l'anion superoxyde (Cathcart et al, 1985; Esterbauer et al, 1992; Heinecke 1994) peuvent endommager les lipides, les protéines et les acides nucléiques par des réactions impliquant des ions métalliques. Des études ont d'ailleurs mis en évidence que le taux d'oxydation des LDL est directement proportionnel au taux de génération de l'anion superoxyde dans les cellules endothéliales et les fibroblastes (Steinbrecher, 1988), ainsi que dans les SMC (Heinecke et al, 1986). De plus,

l'initiation de l'oxydation des LDL par les monocytes semble liée à la sécrétion de cet anion (Cathcart et al, 1989).

Les LDL peuvent également être oxydées par la libération de thiols. Les cellules, comme les SMC, les macrophages et les cellules endothéliales par exemple, peuvent capturer des acides aminés comme la L-cystine (forme disulfite de la L-cystéine), les réduire en thiols et les exporter dans le milieu extra-cellulaire. Les thiols vont alors s'auto-oxyder, avec libération de radicaux libres et d'anion superoxyde, et ainsi favoriser la peroxydation lipidique en réagissant avec les AGPI de la surface des LDL (Heinecke, 1994; Sparrow et Olszewski, 1993).

Certaines enzymes cellulaires comme les lipoxgénases (LO) ont également été impliquées dans l'oxydation des LDL. La 15-LO notamment, présente dans les macrophages péritonéaux murins, a la capacité d'introduire une molécule d'oxygène dans les AGPI, ceux-ci étant alors convertis en hydroperoxydes lipidiques et pouvant ainsi oxyder les LDL (Rankin et al, 1991; Heinecke, 1994). Une autre enzyme cellulaire, la myéloperoxydase, libérée par les macrophages et les monocytes peut également médier l'oxydation des LDL par un processus indépendant des ions métalliques (Daugherty, 1994). Ceci est important car l'oxydation *in vitro* des LDL médiée par les cellules nécessite dans la plupart des cas la présence d'ions métalliques. Les connaissances actuelles ne permettent pas de dire s'il existe dans la paroi artérielle *in vivo*, des ions métalliques libres, bien que des complexes d'ions métalliques libres, comme le cuivre dans la céruloplasmine, soient considérés comme des pro-oxydants (Ehrenwald et al, 1994).

D'autres mécanismes peuvent également participer à l'oxydation des LDL. Par exemple, le glucose, particulièrement en présence d'espèces oxygénées réactives, peut s'auto-oxyder, accélérant ainsi la peroxydation lipidique (Kawamura et al, 1994). De façon similaire, les produits de la glycosylation non enzymatique (AGE) qui existent dans les cas d'hyperglycémie chronique, peuvent former des radicaux libres intermédiaires réactifs qui peuvent favoriser de façon indépendante la peroxydation lipidique (Bucala et al, 93). Les mécanismes impliqués dans l'oxydation des lipoprotéines *in vitro* sont multiples, mais de nombreuses inconnues existent encore, en ce qui concerne l'oxydation *in vivo*, dans la paroi artérielle.

#### **I.3.2.1.3 Propriétés athérogéniques des LDL oxydées**

Quand les LDL subissent une oxydation, différents produits sont formés, dont certains très polaires, pouvant affecter les cellules avoisinantes. Par exemple, la lysolécithine (ou lysophosphatidylcholine), produite au cours de l'oxydation des LDL peut induire l'expression de molécules d'adhésion pour les monocytes à la surface des cellules endothéliales (Kume et al, 1992), et peut constituer un chémoattractant pour les monocytes et les cellules T (Quinn et al, 1987; McMurray et al, 1993). Des aldéhydes réactifs, présents aussi dans les LDL oxydées, semblent être responsables de la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages (Thomas et al, 1994). En plus, d'autres produits des LDL oxydées peuvent induire l'expression de la MCP-1 et du M-CSF par les cellules (Cushing et al, 1990; Rajavashisth et al, 1990). Ces cytokines vont attirer les monocytes dans l'espace sous-endothélial et affecter leur croissance et leur différenciation en macrophages. D'autres

composés des LDL oxydées sont cytotoxiques et peuvent contribuer à la rupture de l'intégrité des cellules endothéliales (Cathcart et al, 1985; Hessler et al, 1983). De plus, les métalloprotéinases libérées par les macrophages activés, entraînent la dégradation et la désorganisation de la matrice (Galis et al, 1994). Le **tableau I** énumère les principaux effets athérogéniques des LDL oxydées.

**Tableau I** Effets biologiques proathérogéniques des LDL oxydées

---

1. Sont capturées de façon non régulée par les macrophages, conduisant à un enrichissement de ces cellules en ester de cholestérol et à la formation de cellules spumeuses.
2. Stimulent l'expression de PDGF $\beta$  par les SMC et diminuent la production de PDGF $\beta$  par les cellules endothéliales et les macrophages.
3. Sont chémoattractrices pour les monocytes (induisent la sécrétion de MCP-1) et les SMC.
4. Sont cytotoxiques et inhibent la mobilité des macrophages tissulaires favorisant leur rétention dans la lésion athéromateuse.
5. Induisent l'expression de M-CSF et de IL-1 par les macrophages, l'expression endothéliale de molécules d'adhésion et inhibent l'expression de TNF $\alpha$  par les monocytes/macrophages.
6. Augmentent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales.
7. Induisent plusieurs gènes proinflammatoires et leurs produits (hémoxigénase et céruloplasmine).
8. Sont immunogènes et peuvent induire la formation d'auto-anticorps et de cellules T réactives.
9. Sont plus sensibles à l'agrégation, ce qui conduit de façon indépendante à l'augmentation de leur captation par les macrophages.
10. Altèrent la voie de la coagulation en induisant le facteur tissulaire et en altérant l'agrégation plaquettaire.
11. Ont des effets néfastes sur les propriétés vasomotrices des artères coronaires, induisent la synthèse de l'endothéline-1, un facteur vasoconstricteur.

---

(Modifié de Reaven et Witztum 1996; et de Esterbauer et al, 1997).

### **I.3.2.2 Adhésion des monocytes**

L'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire est un phénomène physiologique se produisant principalement dans la région post-capillaire des vaisseaux sanguins. Dans des conditions normales, l'adhésion et la séquestration des monocytes circulants ne sont pas stimulées. L'efflux des monocytes du flux sanguin dans les tissus assure uniquement le maintien de la population de macrophages dans un compartiment tissulaire donné (Beekhuisen et van Furth, 1993). Pendant une réaction inflammatoire, les cytokines libérées localement modulent l'interaction des monocytes avec les cellules endothéliales, et l'adhésivité de l'endothélium est alors augmentée. De façon concomitante, les monocytes entrent dans les tissus sous-endothéliaux et s'accumulent au niveau des sites d'inflammation (Wang et al, 1994). Le recrutement des cellules mononucléées dans la paroi artérielle, est un des premiers événements dans le développement de l'athérosclérose. Les monocytes adhèrent de façon spécifique aux cellules endothéliales artérielles endommagées, et après diapédèse, donnent naissance aux cellules spumeuses (Ross, 1986). Une étape importante dans le processus d'extravasation est l'adhésion des monocytes circulants aux cellules endothéliales médiée par les molécules d'adhésion ("cell adhesion molecules", CAM) à la surface des cellules participantes. Les CAM, en liant les monocytes circulants aux cellules endothéliales régulent l'état d'activation de ces cellules et la production de cytokines aux sites inflammatoires (Weyrich et al, 1995).

### **I.3.2.2.1 Molécules d'adhésion**

L'adhésion des monocytes suit une séquence d'évènements qui implique la coopération de différents mécanismes d'adhésion, et de différentes CAM. Les cellules endothéliales élaborent des CAM spécifiques pour les leucocytes de façon constitutive ou en réponse à des cytokines ou autres médiateurs et les monocytes circulants possèdent des récepteurs pour ces CAM. Un certain nombre de molécules présentes à la surface des monocytes et des cellules endothéliales, ont été décrites. Sur la base des propriétés biochimiques de ces molécules et de leur structure moléculaire, les CAM sont classées en trois familles: la superfamille des immunoglobulines, la famille des intégrines et la famille des sélectines. Il existe également une quatrième famille de molécules d'adhésion qui sont les cadhérines, impliquées dans l'intégrité des couches épithéliales et endothéliales (Springer, 1990). Les **figures 3a et 3b** résument la classification de ces molécules d'adhésion, en fonction de leur implication dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales.

#### **- La superfamille des immunoglobulines (Figure 2a)**

Cette famille regroupe un grand nombre de molécules, qui ont en commun un ou plusieurs domaines ressemblant aux immunoglobulines (Ig), appelés "Ig-like" et qui sont impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion des leucocytes. Parmi ces molécules, la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1) sont les plus connues. ICAM-1, encore appelée CD54, est une glycoprotéine



à chaîne simple qui possède 5 domaines "Ig-like" extracellulaires (Dosquet et al, 1992). Elle est exprimée à la surface des cellules endothéliales vasculaires et de nombreux autres types cellulaires (cellules épithéliales, fibroblastes et leucocytes). Les faibles niveaux d'ICAM-1 exprimés par les cellules endothéliales peuvent être augmentés par un traitement avec le  $TNF\alpha$ , l' $INF-\gamma$  ou l'IL-1, mais pas avec l'interleukine-4 (IL-4) (Dosquet et al, 1992). L'expression de ICAM-1 est maximale après 16-24 heures de stimulation et reste élevée pendant au moins 72 heures (Scholz et al, 1996). ICAM-1, exprimée à la surface des cellules endothéliales peut servir de ligand pour au moins deux membres de la famille des intégrines leucocytaires: le "macrophage antigen-1" (Mac-1 ou CD11b/CD18) et le "lymphocyte function related antigen-1" (LFA-1 ou CD11a/CD18) (Dosquet et al, 1992; Faull, 1995).

VCAM-1, appelée dans le passé "molécule d'adhésion inductible-110" (INCAM-110) et clonée comme un récepteur pour les lymphocytes, est présente sur les cellules endothéliales après traitement avec le  $TNF\alpha$ , l'IL-4 ou l'IL-1 (mais pas avec l' $INF-\gamma$ ) (Gille et al, 1996). C'est une glycoprotéine à chaîne simple qui possède 6 ou 7 domaines "Ig-like". Son ligand sur les leucocytes est le "very late antigen-4" (VLA-4 ou CD49d/CD29), une intégrine  $\beta 1$ , exprimée par les monocytes, les lymphocytes et les granulocytes (Dosquet et al, 1992; Beekhuisen et Van Furth, 1993).

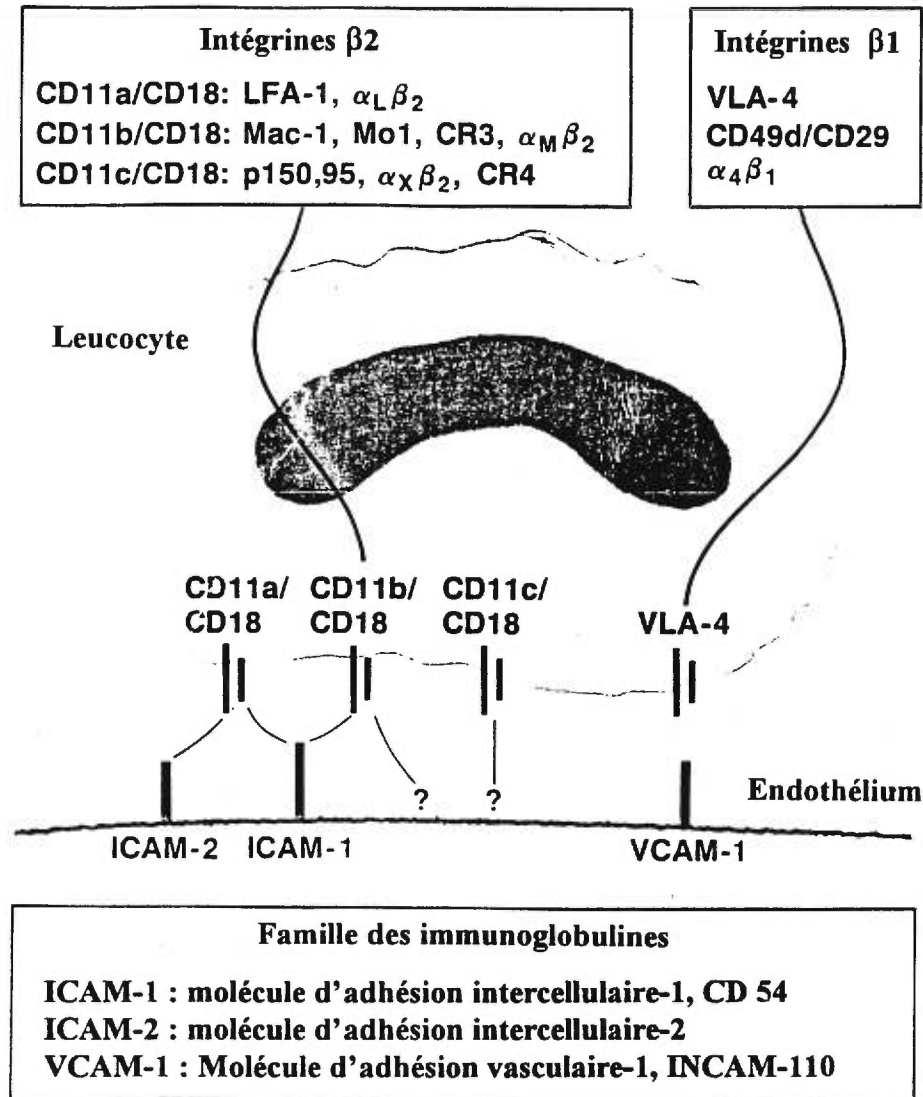


Figure 3a. Molécules d'adhésion de la famille des intégrines et des immunoglobulines, impliquées dans les interactions monocytes-cellules endothéliales (Modifié de Harlan et al, 1992).

Les autres membres, moins connus, de cette famille sont les molécules intercellulaires -2 et -3 (ICAM-2, ICAM-3) qui sont d'autres ligands pour LFA-1, mais dont l'expression n'est pas affectée par les cytokines (expression constitutive). ICAM-2 est exprimée à la surface des cellules endothéliales, activées ou non, des lymphocytes T et B et des plaquettes. ICAM-3, présente sur les leucocytes, semble jouer un rôle dans l'initiation

de la réponse immunitaire (Staunton et al, 1989; Faull, 1995). Enfin, la dernière molécule importante est la "platelet endothelial cell adhesion molecule-1" ou PECAM-1, récemment clonée, et qui est présente sur les cellules endothéliales (au niveau des jonctions intercellulaires), les plaquettes, et les leucocytes (Dosquet et al, 1992; Newman 1997). Les ligands de PECAM-1 ne sont pas encore identifiés, et PECAM-1 serait exprimée de façon constitutive. Son rôle serait important dans le maintien de l'intégrité de la monocouche des cellules endothéliales (Scholz et al, 1996; Newman, 1997).

### **- La famille des sélectines (Figure 3a)**

Les sélectines ont originalement été décrites sur les lymphocytes (L-sélectine), les plaquettes (P-sélectine) et les cellules endothéliales (E-sélectine). Par contraste avec les intégrines et la famille des Ig, les sélectines n'ont été trouvées jusqu'à présent que sur les cellules circulantes et les cellules endothéliales. Les 3 molécules de cette famille possèdent un domaine terminal  $\text{NH}_2$ , similaire à celui décrit dans les lectines dépendantes du calcium, suivi d'un domaine ressemblant au facteur de croissance épidermique ("EGF-like"). Leur structure leur a d'ailleurs valu le nom de "lectin adhesion molecule-1,2,3" (LECAM-1,2,3). Le domaine lectine est celui impliqué dans le processus d'adhésion (Paulson, 1992).

Récemment, il a été démontré que les intégrines pouvaient fonctionner comme des récepteurs pour la transduction d'un signal, stimulant un certain nombre de voies de signalisation intracellulaire qui régulent le développement et la vie de la cellule. Les intégrines sont connues pour stimuler les niveaux de calcium intracellulaire (Sjaastad et Nelson, 1997).

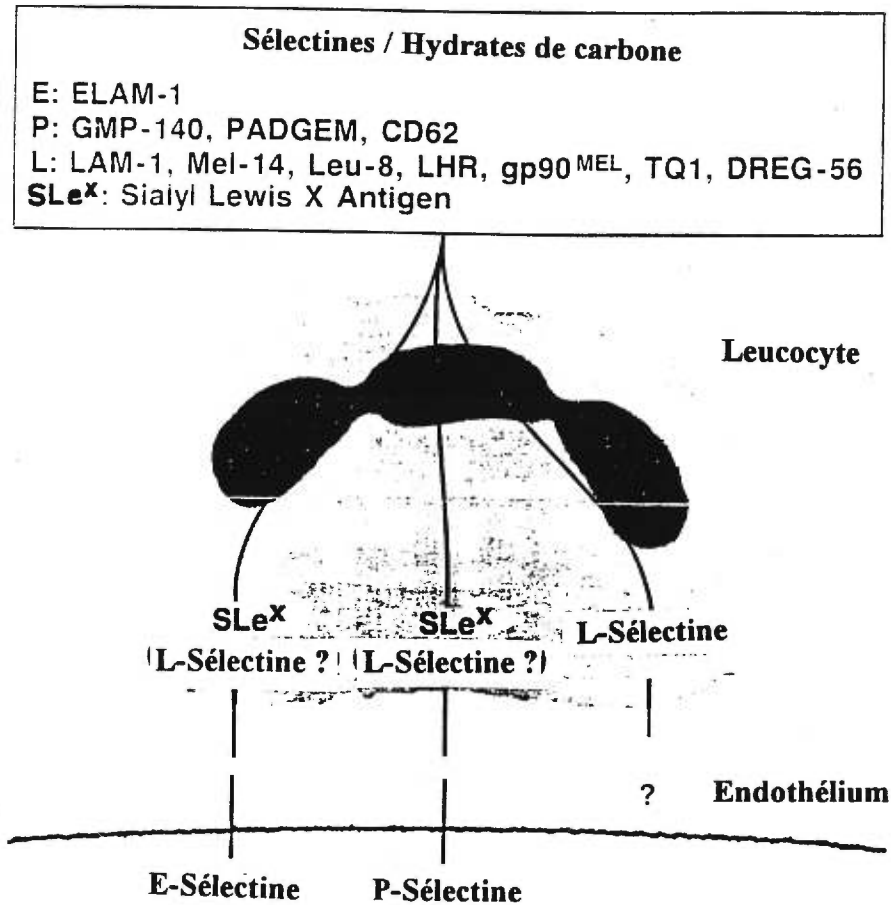


Figure 3b. Molécules d'adhésion des sélectines, impliquées dans les interactions monocytes-cellules endothéliales (Modifié de Harlan et al, 1992).

La sélectine la plus connue est la E-sélectine, ou "endothelial leukocyte adhesion molecule-1" (ELAM-1). C'est une glycoprotéine à chaîne simple qui n'est pas exprimée sur l'endothélium non stimulé mais qui peut être induite par le  $\text{TNF}\alpha$  et  $\text{IL-1}\alpha$  avec un maximum d'expression au bout de 4-6 heures. (Dosquet et al, 1992; Scholtz et al, 1996).

Les ligands de ELAM-1 ne sont pas encore complètement caractérisés, mais il semble que le domaine lectine de la molécule reconnaisse des oligosaccharides trouvés sur les glycolipides et les glycoprotéines, appelés sialyl-Lewis X (Sle<sup>x</sup>) et sialyl-Lewis A (Sle<sup>a</sup>). ELAM-1 peut également lier la L-sélectine glycosylée (Beekhuisen et van Furth, 1993).

Le deuxième membre de cette famille, la P-sélectine ou "granule membrane protein-140" (GMP-140) est une glycoprotéine membranaire intégrale, localisée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Des agonistes comme la thrombine, l'histamine ou les leucotriènes (LTB<sub>4</sub> ou LTC<sub>4</sub>) induisent une rapide redistribution des molécules de P-sélectine à la surface cellulaire après 5 ou 30 minutes de stimulation (McEver et al, 1989; Dosquet et al, 1992). Un des composants du ligand de la P-sélectine, présent sur les neutrophiles et les monocytes, serait CD15 connu sous le nom de Lewis X (Springer et Lasky, 1991).

Enfin, la L-sélectine, connue sous de nombreux autres noms (entre autres, "leukocyte adhesion molecule-1" ou LAM-1, Leu-8, Ly-22, TQ1, gp90<sup>Mel-14</sup>, CD62L,...) a été initialement connue sous le nom du récepteur du ganglion lymphatique. Elle est exprimée par 70% des lymphocytes circulants et aussi par les neutrophiles et les monocytes. Les ligands de la L-Sélectine seraient comme pour ELAM-1, les fractions hydrates de carbone de sialyl-Lewis X (Sle<sup>x</sup>) et sialyl-Lewis A (Sle<sup>a</sup>) (Dosquet et al, 1992; Beekhuisen et van Furth, 1993). De plus, la L-sélectine pourrait agir directement sur des épitopes, encore non identifiés des molécules E- et P-sélectine à la surface des cellules endothéliales (Picker et al, 1991).

### - Les famille des intégrines (Figure 3a)

La dernière famille des molécules d'adhésion, les intégrines comprend les ligands des molécules de la famille des Ig (ICAM-1,2,3 et VCAM-1). Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) associées de façon covalente. Jusqu'à présent, 15 sous-unités  $\alpha$  et 8  $\beta$  ont été décrites formant ainsi 21 molécules d'intégrines différentes (revue par Faull, 1995). Ces molécules d'adhésion peuvent lier les protéines de la membrane basale (laminine et collagène) et il y a également des interactions avec les protéines inflammatoires, de thrombose, et de développement de la matrice comme la fibronectine et le fibrinogène. Ces molécules jouent également un rôle important dans la coagulation sanguine (revue par Beekhuisen et van Furth, 1993; Faull, 1995). Dans la famille des intégrines, deux grands groupes se détachent, les intégrines  $\beta 1$  et les intégrines  $\beta 2$ .

Tout d'abord, dans le groupe des intégrines  $\beta 1$ , se trouvent les protéines appelées "very late after activation proteins" ou protéines VLA car leurs membres principaux, VLA-1 et VLA-2 apparaissent à la surface des lymphocytes T, 2 à 7 semaines après stimulation *in vitro* (Beekhuisen et Van Furth, 1993). La molécule la plus connue est VLA-4 (composé des sous-unités  $\alpha 4\beta 1$ ), appelé également CD49d/CD29, et qui est le ligand de VCAM-1, présent sur les monocytes, les lymphocytes et les granulocytes (Young et Khwaja, 1990; Dosquet et al, 1992).

Parmi les intégrines  $\beta 2$ , LFA-1, Mac-1 et P150,95 sont les plus importantes et sont présentes sur les monocytes. Elles pourraient jouer un rôle dans l'adhésion des monocytes humains à l'endothélium vasculaire. La stimulation des monocytes par différents

médiateurs (PDGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , leucotriène B4) entraîne la mobilisation rapide des intégrines  $\beta$ 2 du compartiment intracellulaire, à la surface de la cellule (Revue par Dosquet et al, 1992). Le LFA-1 (CD11a/CD18) médie les fonctions des cellules T cytotoxiques et des cellules T "helper" qui dépendent de l'adhésion, et sert de ligand pour les ICAM-1,2 et 3. Mac-1 (CD11b/CD18) possède comme ligand connu ICAM-1. Enfin, p150,95 (CD11c/CD18) n'est pas très bien connu, et ces ligands non plus. Cette molécule est stockée dans des granules (peroxydase-négatif) présents dans les monocytes et les granulocytes au repos (Revue par Beekhuisen et van Furth, 1993).

#### **I.3.2.2.2 Adhésion des monocytes aux cellules endothéliales**

Les molécules L-sélectine et VLA-4 sur les monocytes, ainsi que ELAM-1 et VCAM-1 sur les cellules endothéliales participent au premier contact monocytes-cellules endothéliales, lorsque ces dernières sont stimulées par des cytokines. Les sélectines médient le premier attachement ("tethering") des leucocytes aux cellules endothéliales en l'espace d'une milli-seconde (Springer, 1994). La liaison des leucocytes avec ELAM-1 active les intégrines, qui vont alors réagir avec leurs ligands respectifs. Les monocytes, vont alors se lier via leurs intégrines  $\beta$ 2 et  $\beta$ 1, à ICAM-1 et VCAM-1 respectivement, présentes à la surface des cellules endothéliales. Les cellules vont ainsi établir un contact plus ferme avec l'endothélium, ce qui va faciliter leur migration trans-endothéliale (revue par Wang et al, 1994; Scholz et al, 1996). Un grand nombre de publications concernent les interactions neutrophiles - cellules endothéliales, mais maintenant, de plus en plus d'études

sont effectuées sur l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire car ceux-ci ont un rôle très important dans l'athérogenèse.

Les monocytes comparés aux granulocytes ou aux lymphocytes ont un niveau d'adhésion élevé pour les cellules endothéliales en culture. Des études de microcinématographie ont montré que le site primaire d'attachement des monocytes aux cellules endothéliales se fait au hasard. Mais, après migration à la surface des cellules endothéliales, les monocytes ont tendance à s'accumuler sur les bords des cellules endothéliales car la membrane périphérique ondule afin d'empêcher la migration des monocytes vers une cellule endothéliale adjacente, ou alors la surface cellulaire à la périphérie est plus adhésive. Si la dernière hypothèse est vraie, on peut supposer que les CAM récemment découvertes sur les plaquettes, les monocytes et les cellules endothéliales comme PECAM-1, ont un rôle important et pourraient réagir avec les molécules exprimées par les monocytes (Revue par Beekhuisen et van Furth, 1993). L'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales non stimulées est diminuée de 40 à 70% quand les monocytes sont incubés en présence d'anticorps anti-CD11(a et b) et anti-CD18, suggérant un rôle majeur de ces antigènes monocytaires dans le processus d'adhésion. L'inhibition partielle de l'adhésion observée en présence de ces anticorps, laisse à penser que d'autres molécules, encore inconnues puissent être impliquées dans les phénomènes d'adhésion (Revue par Beekhuisen et van Furth, 1993).

Un trait caractéristique de la réponse inflammatoire est l'accumulation locale de leucocytes. Des études *in vitro* ont démontré qu'une incubation de cellules endothéliales avec des cytokines (IL-1, IL-4, TNF $\alpha$ , INF- $\gamma$ ), augmentait l'adhésivité des cellules endothéliales pour les leucocytes d'une manière dépendante du temps de traitement et de la



concentration de cytokines utilisée (Pober et Cotran, 1990; Beekhuisen et van Furth, 1993). Le mécanisme d'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales stimulées par l'IL-1 $\alpha$  ou la LPS, contrairement aux granulocytes ou aux lymphocytes, ne fait pas intervenir les intégrines  $\beta$ 2 ou ICAM-1, ou du moins, celles-ci ne semblent pas essentielles. Par contre, ELAM-1 exprimée par les cellules endothéliales paraît jouer un rôle important dans ce processus, car son ligand existe (sialyl-Lewis X) sur les monocytes. Il doit cependant exister d'autres CAM, comme VCAM-1, qui pourraient se lier à VLA-4. Cependant, l'utilisation d'anticorps anti-ELAM-1 et VCAM-1 n'inhibe pas de façon majeure l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales stimulées par des cytokines. ICAM-1 et -2 pourraient également être impliquées dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, en interaction avec les molécules CD11/CD18 (revue par Beekhuisen et van Furth, 1993).

Les monocytes, quelques minutes après leur liaison initiale aux cellules endothéliales peuvent changer leur morphologie (étirement) puis migrer dans une direction latérale sur la surface apicale des cellules endothéliales. Le pourcentage de monocytes liés avec une morphologie d'étirement est relativement bas sur les cellules endothéliales non stimulées (23% des monocytes liés) et augmente de 2 ou 3 fois après stimulation des cellules endothéliales par des cytokines. Cette déformation des monocytes est fortement inhibée par des anticorps anti-ICAM-1, moins fortement par des anti-CD11a ou -CD18, et non affectée par des anticorps anti-VCAM-1 (revue par Beekhuisen et van Furth, 1993). L'étirement des monocytes semble donc impliquer la reconnaissance de ICAM-1 sur les cellules endothéliales par certains antigènes monocytaires dont LFA-1 et cet étirement serait activement régulé par les cellules endothéliales. Les interactions adhésives des cellules sont

médiées par un grand nombre de récepteurs cellulaires qui partagent néanmoins des caractéristiques communes. Dans le cas de l'interaction monocytes - cellules endothéliales, quelques paires de molécules d'adhésion pourraient être impliquées comme ICAM-1/LFA-1, Mac-1; VCAM-1/VLA-4; ELAM-1/hydrate de carbone (Dosquet et al, 1992).

### **I.3.2.2.3 Adhésion et diabète**

Les patients atteints d'un DNID présentent par rapport à la population normale, des niveaux sériques plus élevés de molécules d'adhésion solubles. Cependant, les études ne sont pas toutes unanimes en ce qui concerne les molécules impliquées. La plupart des études mettent en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques d'ELAM-1 (Steiner et al, 1994; Cominacini et al, 1995; Fashing et al, 1996). Par contre, les niveaux d'ICAM-1 peuvent être augmentés (Cominacini et al, 1995; Cerellio et al, 1996; Fashing et al, 1996) ou stables (Steiner et al, 1994). Les niveaux sériques de VCAM-1 ne sont pas modifiés dans certaines études (Cominacini et al, 1995), alors qu'ils augmentent dans d'autres (Steiner et al, 1994; Fashing et al, 1996). Les concentrations plasmatiques d'ELAM-1 (Cominacini et al, 1995) et d'ICAM-1 (Cerellio et al, 1996) semblent être en corrélation positive avec les niveaux d'hémoglobine glycosylée (HbA1c) chez les patients diabétiques, sans montrer toutefois de relation avec les concentrations plasmatiques des lipides (Cominacini et al, 1995; Fashing et al, 1996). Une augmentation de la concentration plasmatique des CAM solubles reflète un clivage protéolytique accru du domaine extracellulaire de ces molécules. Les conditions de la libération des CAM, tronquées mais fonctionnelles ne sont pas clairement définies (Gearing et Newman, 1993). Mais, une

augmentation de la quantité de CAM circulante pourrait indiquer d'une part une activation de l'endothélium et d'autre part, une augmentation de l'interaction des leucocytes et des plaquettes avec cet endothélium (Cominacini et al, 1995). Ces changements observés dans les niveaux de CAM circulantes pourraient donc refléter des altérations de l'endothélium et/ou une activation excessive des leucocytes chez les sujets diabétiques NID. Cette élévation semblerait être la conséquence des anomalies métaboliques présentes dans le diabète, à savoir l'augmentation de l'oxydation des LDL et de la formation des AGE (Fasching et al, 1996).

Dans le diabète, il existe une autre anomalie métabolique pouvant être responsable des niveaux altérés des CAM circulantes, c'est l'hyperglycémie. Des cellules endothéliales en culture soumises à une forte quantité de glucose montrent une augmentation de l'expression d'ICAM-1. Par contre, les niveaux d'ELAM-1 et de VCAM-1 demeurent inchangés (Baumgartner-Parzer et al, 1995; Taki et al, 1996). L'expression des CAM peut donc être modulée en réponse à une forte concentration de glucose et ce phénomène pourrait suggérer une dysfonction de l'endothélium dans le diabète. Cette variation dans les concentrations de ICAM-1 se traduit au niveau de l'interaction monocytes-endothélium. Des études *in vitro* ont mis en évidence que des monocytes humains normaux adhèrent plus à des cellules endothéliales en culture soumises de façon prolongée à une concentration élevée de glucose. Par contre, une exposition aiguë des cellules endothéliales à une forte concentration de glucose n'altère pas la liaison des monocytes aux cellules endothéliales (Kim et al, 1994). Dans ce système, les CAM impliquées seraient les intégrines  $\beta_2$  qui sont les ligands d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales. D'autres études *in vitro* (Dosquet et al, 1992) ont montré une augmentation de l'adhésivité de monocytes isolés de sujets DID aux

cellules endothéliales en culture. Cette fois encore, les intégrines  $\beta 2$  seraient impliquées dans ce phénomène. L'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales semble donc être facilitée chez les patients diabétiques, d'une part par des concentrations plasmatiques de CAM solubles plus élevées, reflétant une activation accrue de l'endothélium, et d'autre part, par une augmentation de l'adhésivité des monocytes eux-mêmes.

### **I.3.2.3 Glycosylation non enzymatique**

L'exposition de protéines ou de lipides à des aldoses (comme le glucose), résulte en une glycosylation non enzymatique par addition covalente de sucres réduits sur les groupes aminés primaires de macromolécules (réaction de Maillard). Au début, il y a formation de produits de glycosylation intermédiaires et réversibles appelés base de Schiff qui vont se réarranger en produits plus stables, appelés produits d'Amadori (Bunn et Higgins, 1981; Ruderman et al, 1992). Après d'autres réarrangements moléculaires complexes, des déshydratations, et des réactions d'oxydo-réduction, ces produits deviennent des produits finaux de glycosylation alors irréversibles ou AGE (Brownlee et al, 1988; Baynes, 1991). La formation des AGE à partir des produits d'Amadori nécessite la présence d'oxygène moléculaire et ce processus est catalysé par des métaux de transition. Par contre, des agents réducteurs comme l'ascorbate peuvent inhiber la formation des AGE (Revue par Chappey et al, 1997). Les AGE constituent une classe de structures hétérogènes de couleur jaune-brune, de fluorescence caractéristique, formant des liaisons croisées entre les protéines.

En dépit d'intenses recherches, la structure chimique des AGE *in vivo* n'est pas encore clairement définie. Mais à l'aide de méthodes immunocytochimiques, des AGE

immunoréactives ont pu être identifiées dans différents tissus *in vivo*, notamment, au niveau du collagène de la membrane basale et de l'hémoglobine des globules rouges. Les AGE affectent alors les propriétés fonctionnelles de ces macromolécules (Makita et al, 1992). Les AGE sont également retrouvées dans le cristallin et au niveau des lésions athéromateuses dans les artères coronaires humaines (Horiuchi et al, 1991). Les protéines ne sont pas les seules touchées car les lipoprotéines peuvent également être glycosylées, notamment les LDL. A titre d'exemple, il existe des AGE-LDL qui circulent dans le plasma des patients diabétiques (Lyons et al, 1986; Bucala et al, 1993). De plus, des études *in vitro* ont mis en évidence que le glucose peut s'incorporer dans l'apo B des LDL, et ceci de façon directement proportionnelle à la concentration ambiante en glucose, et au temps d'exposition des LDL au glucose (Lyons, 1992). Comme les AGE sont attachées aux molécules de façon irréversible, leur niveau ne décroît pas quand l'hyperglycémie est corrigée. Au contraire, ces produits continuent de s'accumuler à des taux variables pendant la durée de vie des composants des tissus diabétiques (Brownlee et al, 1988).

Quelques types cellulaires comme les monocytes, les macrophages et les lymphocytes humains et murins, sont capables de lier les protéines glycosylées (Revue par Chappey et al, 1997). Des récepteurs pour les AGE, purifiés à partir d'extraits de membranes cellulaires, ont été isolés sur ces cellules, mais également sur les cellules endothéliales (Yang et al, 1991; Schmidt et al, 1994). Ces récepteurs font partie de la superfamille des immunoglobulines des molécules de surface cellulaire et médient les interactions avec les AGE *in vitro* et *in vivo*. Ils sont exprimés dans le système vasculaire normal et diabétique (Schmidt et al, 1994 et 1996).

### I.3.2.3.1 Propriétés et conséquences fonctionnelles des AGE (Figure 4)

Les AGE, par interaction avec leur récepteur au niveau des cellules, sont à l'origine de nombreux évènements pathogéniques, dont les principaux sont résumés dans la **figure 4**. La liaison des AGE au niveau des récepteurs du macrophage induit la sécrétion de cytokines comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Vlassara et al, 1988). La production de facteurs de croissance comme IGF-1, peut également être induite, à des concentrations qui stimulent la synthèse glomérulaire du collagène et la prolifération des cellules endothéliales et des SMC (Kirstein et al, 1992). Les AGE formés *in vivo* et *in vitro* sont chémotactiques pour les monocytes humains. Ainsi, les AGE présents dans l'espace sous-endothelial vont sélectivement induire la migration des monocytes à travers un endothélium intact et l'interaction subséquente des monocytes avec les AGE contenus dans la matrice va conduire à l'expression de PDGF $\beta$ . Ce facteur de croissance, mitogénique pour les SMC, semble jouer un rôle dans le développement des lésions athérosclérotiques prolifératives (Kirstein et al, 1990).

La liaison des AGE à leur récepteur sur les cellules endothéliales, induit un stress oxydatif cellulaire qui se traduit par la formation de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS), et par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B avec des conséquences nombreuses au niveau des fonctions cellulaires (Schmidt et al, 1996). En effet, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un régulateur pléiotropique de nombreux gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires.

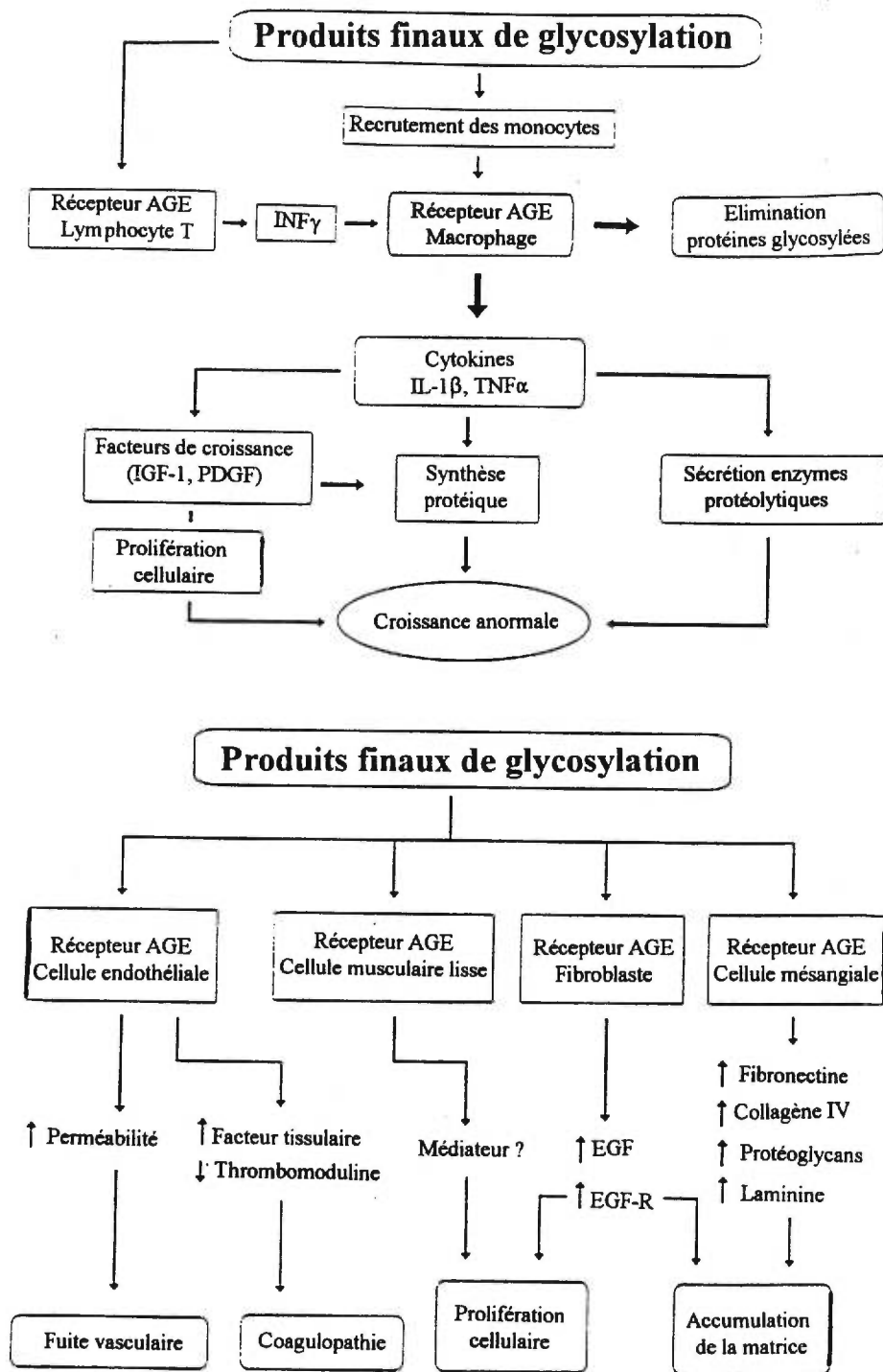


Figure 4. Représentation schématique du rôle possible des AGE par interaction avec leur récepteur dans les événements pathologiques associés aux complications diabétiques (Adapté de Vlassara, 1994).

Le NF- $\kappa$ B peut induire l'expression de TNF $\alpha$ , de MCP-1 et d'une variété de molécules d'adhésion (revue par Collins et al, 1995). La liaison des AGE aux cellules endothéliales peut également être à l'origine d'une augmentation de l'activité du facteur tissulaire qui active les facteurs de coagulation IX et X. En même temps, il y a une réduction rapide de l'activité de la thrombomoduline qui empêche l'activation de la voie anticoagulante. Il y a également élévation de la production d'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur. Enfin, il y a augmentation de la perméabilité de la monocouche des cellules endothéliales (revue par Brownlee, 1992 et Vlassara, 1994).

En dehors des cellules, les AGE peuvent avoir des effets directs sur les macromolécules. La glycosylation des protéines induit des altérations dans leur comportement métabolique dans des systèmes *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, l'insuline, qui peut être glycosylée, va être biologiquement moins active (Schwartz et al, 1992). Le collagène peut former des liaisons croisées avec les AGE, ce qui va augmenter sa rigidité et l'épaisseur de la membrane basale. Ce complexe va pouvoir piéger de façon covalente les protéines de la matrice ou les protéines circulantes comme les LDL et les IgG (Brownlee, 1992; Vlassara, 1996). Les LDL peuvent également être glycosylées et elles sont alors capables d'induire l'accumulation de cholestérol estérifié dans les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales aortiques en culture, ce qui pourrait augmenter la formation de cellules spumeuses. De plus, les LDL glycosylées *in vitro* ou isolées de patients diabétiques ne sont plus reconnues par le récepteur classique des LDL, ce qui conduit à un retard de leur clairance plasmatique et à une augmentation de leur captation par les macrophages via un récepteur encore mal défini, mais qui ne serait pas le récepteur "scavenger" (Sobenin et al, 1996; Lyons, 1992). Enfin, les LDL



glycosylées sont plus sensibles à l'oxydation que les LDL normales. Les AGE qui se forment directement dans la phase lipidique des LDL peuvent oxyder les liens insaturés contenus dans les chaînes latérales des acides gras, même en l'absence d'ions métalliques exogènes (utilisés *in vitro* pour initier l'oxydation des lipides) (Bucala et al, 1993).

#### 1.3.2.3.2 AGE et adhésion

En plus de tous les rôles possibles des AGE déjà cités (**Figure 4**), celles-ci semblent impliquées dans les phénomènes d'adhésion et d'interaction monocytes-endothélium. Des études récentes ont mis en évidence que les AGE préparés *in vitro* ou isolés de patients diabétiques peuvent induire dans des cellules endothéliales en culture, l'expression des fractions solubles et associées aux cellules de VCAM-1 (Schmidt et al, 1995; Vlassara, 1995) et dans certains cas d'ICAM-1 (Vlassara, 1995). L'augmentation de l'expression de VCAM-1, semble se faire par un mécanisme impliquant la liaison des AGE à leur récepteur, avec induction d'un stress oxydatif, et activation du NF- $\kappa$ B qui possède des sites de liaison dans le site promoteur du gène VCAM-1 (Schmidt et al, 1995). L'induction de VCAM-1 s'accompagne d'une augmentation de l'adhésion d'une lignée lymphoblastique Molt-4 (qui possèdent VLA-4, le ligand de VCAM-1) à une monocouche endothéliale humaine traitée avec des AGE. Ainsi, par liaison avec leur récepteur, les AGE peuvent induire l'expression de VCAM-1 qui en retour va favoriser l'interaction entre l'endothélium diabétique et les monocytes circulants. De plus, la fraction soluble de VCAM-1 pourrait être un indicateur de la dysfonction cellulaire dans le diabète, mais également un marqueur dynamique pour l'efficacité des interventions thérapeutiques (Schmidt et al, 1995).

#### 1.3.2.4 Facteurs de croissance et fonction monocyttaire

De nombreux arguments cliniques et expérimentaux plaident en faveur d'une participation des leucocytes en pathologie vasculaire. Le diabète, responsable de plusieurs facteurs de risque vasculaire, est associé à des anomalies de la fonction monocyttaire. Les monocytes, et les macrophages qui en dérivent, constituent une source importante de divers facteurs de croissance et de cytokines. Les cytokines semblent avoir un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose, associée au DNID. Cependant, peu d'études existent en ce qui concerne l'implication de ces cytokines dans le DNID. En effet, la plupart des études s'intéressent au DID où les cytokines apparaissent impliquées dans la régulation de certains aspects du diabète, incluant la pathogenèse de la maladie. Par exemple, l'IL-1 $\beta$  produite par les macrophages, est cytotoxique pour les cellule  $\beta$  du pancréas. De même le TNF $\alpha$  peut altérer la sécrétion d'insuline (Pankewycz, 1995). Des patients DID, dont le diagnostic de diabète est récent, ont des niveaux sériques d'interleukine-2 (IL-2), d'INF- $\gamma$ , de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  plus élevés que des patients ayant un DID ou un DNID de longue durée. Ces derniers, comparés à des témoins, ont des niveaux plus élevés de TNF $\alpha$  et d'IL-2 (Hussain et al, 1996). En ce qui concerne le DNID, la plupart des études montrent une augmentation significative des niveaux sériques de TNF $\alpha$  (Nguyen et al, 1995), alors que les niveaux d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 sont normaux (Mooradian et al, 1991; Nguyen et al, 1995).

La production *in vitro* des cytokines par les monocytes est également altérée dans les deux types de diabète. Les monocytes isolés de patients ayant un DID, ont une production basale et stimulée (par la lipopolysaccharide, LPS) d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 moins importante que les monocytes isolés de témoins, alors qu'il n'y a pas de différence dans la

production de  $\text{TNF}\alpha$ . Dans le DNID, la sécrétion d' $\text{IL-1}\beta$  et d' $\text{IL-6}$  par les monocytes n'est pas différente des témoins, alors, qu'en réponse à la LPS, les monocytes stimulés des patients diabétiques produisent plus de  $\text{TNF}\alpha$  que les témoins (Ohno et al, 1993). Cependant, la production basale de  $\text{TNF}\alpha$  est identique dans les deux groupes (Mooradian et al, 1991; Ohno et al, 1993). Parmi les cytokines, le  $\text{TNF}\alpha$  a un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose car il a des propriétés angiogénique, apoptotique et chimio-attractante pour les monocytes. Le  $\text{TNF}\alpha$  favorise aussi l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales en culture et augmente l'expression des molécules d'adhésion (Bevilacqua et Gimbrone, 1987).

Les facteurs de croissance semblent également impliqués dans le développement des complications macrovasculaires du diabète. Cependant, peu de choses sont connues sur la sécrétion systémique ou locale (dans la paroi artérielle) de facteurs de croissance comme le "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) l' "epidermal growth factor" (EGF) ou le "fibroblast growth factor" (FGF) dans le diabète. Par contre, des études ont mis en évidence des niveaux d' "insulin-like growth factor" (IGF-1) augmentés lors de l'amélioration du contrôle glycémique (Revue par Clemmons, 1991). Le PDGF $\beta$  joue également un rôle dans le développement de l'athérosclérose chez les patients diabétiques. Une étude a d'ailleurs mis en évidence que des concentrations élevées de glucose augmentent l'expression du récepteur de PDGF $\beta$  sur les macrophages dérivés de monocytes humains, et augmente la liaison de PDGF $\beta$  à la surface des macrophages. Le PDGF $\beta$  stimule une grande diversité de processus dont la prolifération des cellules musculaires lisses et la chimio-attraction des leucocytes (Inaba et al, 1996). En conclusion, dans le diabète, l'état d'hyperglycémie chronique peut influencer les fonctions cellulaires comme la croissance et la migration.

Cette influence se fait par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance qui jouent ainsi un rôle dans le développement des complications vasculaires du diabète, en particulier de l'athérosclérose.

## **I.4 Traitements du diabète de type 2**

Les approches thérapeutiques pour améliorer le contrôle glycémique chez les patients DNID visent à améliorer la sécrétion d'insuline et à diminuer la résistance à l'insuline, afin de contrôler la glycémie et de prévenir les complications à long terme du diabète (Horton, 1995; Gerich, 1996).

### **I.4.1 Diète et exercice**

La première étape dans le traitement du DNID n'est pas pharmacologique, elle consiste en une combinaison d'une diète adaptée pour induire une perte pondérale, et d'un programme approprié d'exercice. En effet, il a été démontré qu'une perte de poids, même modeste (de l'ordre de 5 kg) permet d'augmenter la tolérance au glucose (Cefalu, 1996). De même, l'exercice régulier améliore la tolérance au glucose, en optimisant l'action de l'insuline au niveau des muscles périphériques, ce qui permet de diminuer les besoins en insuline endogène ou exogène (Cefalu, 1996).

### **I.4.2 Les hypoglycémiantes oraux**

Malencontreusement, chez certains patients, les niveaux de glucose plasmatique vont continuer à s'élever, en dépit d'un programme diététique adapté et d'un exercice régulier. L'administration d'un agent antidiabétique est alors nécessaire. Une combinaison de plusieurs médicaments peut également être envisagée (Cefalu, 1996).

Parmi les hypoglycémifiants oraux, se retrouvent les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase dont l'acarbose. L'inhibition compétitive et réversible des  $\alpha$ -glucosidases intestinales et de l' $\alpha$ -amylase pancréatique par l'acarbose retarde la digestion des hydrates de carbone, ralentit leur digestion et diminue le taux d'absorption du glucose. Il en résulte une diminution proportionnelle à la dose administrée de la glycémie postprandiale et une atténuation de l'insulinosécrétion (Bischoff, 1993).

Un autre groupe de médicaments est composé des biguanides, avec notamment la metformine. Cette substance diminue la résistance à l'insuline et peut également favoriser une perte de poids. De plus, à long terme, la metformine peut diminuer les taux élevés de triglycérides généralement présents dans le DNID (Bailey et al, 1996). La metformine est en général utilisée seule ou en combinaison avec les sulfonylurées qui constituent une troisième famille d'hypoglycémifiants oraux. Les sulfonylurées stimulent principalement la sécrétion basale et stimulée d'insuline, ce qui réduit la production hépatique de glucose et facilite son utilisation périphérique (Henry, 1996). Une utilisation prolongée des sulfonylurées induit également une optimisation de l'action de l'insuline, pouvant résulter de l'amélioration de la glycémie et de la diminution de la glucotoxicité. Beaucoup de personnes peuvent mieux contrôler leur glycémie avec les sulfonylurées, mais le maintien à long terme d'une glycémie proche de la normale est difficile avec cette seule thérapie (Henry, 1996).

#### I.4.1.1 Le gliclazide

Parmi les sulfonylurées dites de seconde génération, le **gliclazide** (Diamicron) est largement utilisé. Le gliclazide est un hypoglycémiant qui agit en augmentant la première et la seconde phase de sécrétion de l'insuline et qui augmente également la sensibilité à l'insuline (Chiasson et al, 1991). Il améliore ainsi la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas, potentialise l'effet insulino-sécréteur du glucose et améliore la dynamique de sécrétion de l'insuline notamment par restauration du pic précoce physiologique (Chiasson et al, 1991). Le gliclazide améliore également le stockage du glucose par potentialisation de la stimulation de la glycogène synthase par l'insuline. Il favorise aussi l'oxydation du glucose et freine sa production hépatique. Le gliclazide affecte directement l'action de l'insuline par le biais d'une action post-récepteur (Alberti, 1994).

L'action hypoglycémiante du gliclazide au niveau pancréatique est liée à la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'adénosine tri-phosphate (ATP) de la cellule  $\beta$ , ce qui inhibe l'efflux de  $K^+$  (Alberti, 1994). Après dépolarisation de la membrane plasmique, les canaux calciques voltage-dépendants (type L) s'ouvrent, et, avec l'action conjuguée des ionophores calciques, les niveaux de calcium intracellulaire sont augmentés. Le calcium agit alors comme un second messenger et semble induire la phosphorylation des protéines qui stimulent la libération d'insuline par exocytose des granules d'insuline (Palmer et Brogden, 1993; Ashcroft, 1996).

### I.4.1.2 Propriétés vasculaires

Indépendamment de son action hypoglycémiante, le gliclazide présente de nombreuses propriétés microvasculaires. Ces propriétés se résument à une normalisation du comportement plaquettaire, un rétablissement de l'équilibre des prostaglandines et à un rétablissement de la fibrinolyse pariétale (Alberti, 1994). Le gliclazide peut aussi diminuer la production excessive de radicaux libres existant dans le diabète. Cet effet se traduit par une diminution du contenu en TBARS et de la quantité de diènes conjugués dans le sérum de patients avec un DNID, après 36 semaines de traitement avec le gliclazide (Florkowski et al, 1988). Une autre étude (Jennings et al, 1992) montre une augmentation du contenu en superoxyde dismutase, une diminution des peroxydes lipidiques et une diminution de l'agrégation des plaquettes après 3 mois de traitement avec le gliclazide, effets non induits par le glyburide, une autre sulfonylurée. Les propriétés spécifiques du gliclazide semblent être dues à son cycle azabicyclo-octyl, qui n'existe pas dans les autres sulfonylurées (Jennings et al, 1992). La **figure 5** illustre la formule chimique du gliclazide.

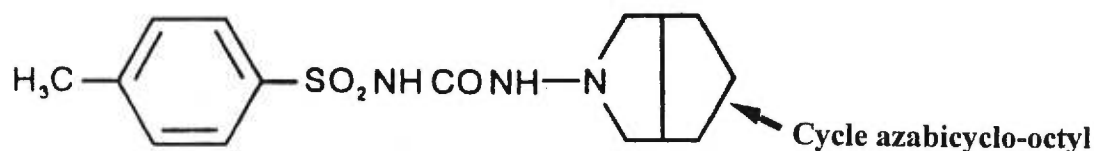


Figure 5. Formule chimique du gliclazide (Palmer et Brogden, 1993).

En résumé, le gliclazide, outre son action hypoglycémiante, serait un puissant piègeur de radicaux libres, contrairement aux autres sulfonylurées. De part ces propriétés non métaboliques, le gliclazide semble donc constituer une thérapie de choix dans le



traitement du DNID. Cependant, aucune donnée n'est disponible, en ce qui concerne les effets du gliclazide sur la fonction monocyttaire et la cellule endothéliale chez les patients diabétiques. D'ailleurs, la fonction monocyttaire est très mal connue dans le DNID traité (par une diète ou des hypoglycémifiants oraux). Il n'existe pas d'études portant sur le rôle du gliclazide dans les processus athérogènes liés au DNID comme l'adhésion des monocytes à des cellules endothéliales en culture et l'oxydation des lipoprotéines.

### **I.4.3 Insuline**

Quand toutes les autres méthodes ont échoué pour contrôler la glycémie, l'apport exogène d'insuline est alors nécessaire. Plusieurs traitements sont disponibles dont la combinaison d'insuline régulière ou lente, qui permettent de contrôler les variations de la glycémie lors des repas. Des stratégies plus agressives incluent l'utilisation de pompes à insuline et d'insuline ultra-lente, combinée à de l'insuline régulière pendant les repas (Cefalu, 1996). L'administration d'insuline à des patients diabétiques NID a de nombreux effets, certains bénéfiques, d'autres délétères. L'insuline exogène peut diminuer l'hyperglycémie et la production hépatique de glucose. Elle améliore également l'utilisation oxydative ou non du glucose et la sécrétion d'insuline en réponse à un repas. La thérapie à l'insuline peut également améliorer le profil lipidique et diminuer la glycosylation non enzymatique des protéines et des lipoprotéines (Koivisto, 1993). Par contre, l'hyperinsulinémie peut avoir des effets athérogéniques sur la paroi artérielle. Des études chez l'animal ont mis en évidence que l'hyperinsulinémie peut augmenter la synthèse de cholestérol et l'activité du récepteur des LDL, altérer la fonction du récepteur des HDL et

augmenter la formation de la plaque lipidique athéromateuse. L'hyperinsulinémie stimule également *in vitro*, les facteurs de croissance, entraînant la synthèse de tissu conjonctif et la prolifération des SMC (Revue par Koivisto, 1993). De plus, chez l'homme, l'insuline exogène est à l'origine d'une surcharge pondérale, d'une rétention des fluides et du sodium, d'une hyperinsulinémie et d'une tendance à l'hypoglycémie (Koivisto, 1993). Ainsi, l'utilisation de la thérapie à l'insuline doit être adaptée à chaque individu, en fonction de son âge, de son espérance de vie et des autres maladies qui peuvent accompagner le DNID.

### 1.5 Hypothèse de travail

Le DNID, désordre métabolique important, serait associé à une activation proathérogène excessive de la fonction monocyttaire-macrophagique. Le gliclazide, une sulfonylurée de seconde génération, largement utilisée dans le traitement du DNID pourrait réduire cette anomalie, de part ses propriétés vasculaires.

Pour étudier la fonction monocyttaire/macrophagique chez les patients diabétiques et les effets du gliclazide, nous nous sommes intéressés aux points suivants:

- 1) oxydation des LDL *in vitro* médiée par des monocytes isolés de patients diabétiques et de sujets normaux, ainsi que par des cellules endothéliales en culture.
- 2) adhésion des monocytes isolés de patients diabétiques et de sujets contrôles à un endothélium vasculaire.
- 3) production de cytokines et de facteurs de croissance, implication de la peroxydation lipidique et des molécules d'adhésion dans le DNID.
- 4) rôle des AGE et des LDL oxydées dans l'adhésion des monocytes à des cellules endothéliales en culture et implication des molécules d'adhésion.

---

## **II. RESULTATS**

Metabolism, 46:1150-1156, 1997

**Gliclazide decreases cell-mediated low density lipoprotein (LDL) oxidation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidatively modified LDL.**

Anne-Cécile DESFAITS, Omar SERRI and Geneviève RENIER.

Metabolic Unit, Notre-Dame Hospital Research Center and Department of Nutrition,  
University of Montreal, Montreal, Canada.

Running title: Effect of gliclazide on LDL oxidation.

Key words: LDL oxidation, monocyte adhesion, endothelial cells, gliclazide.

Presented in part at the 10th International Congress of Endocrinology, San Francisco, June 1996. Supported by Servier.

Reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
Research Center, 3rd floor, Y-3622  
1560 Sherbrooke Street East  
Montreal, Quebec, H2L 4M1  
Phone: (514)-281-6000 #6895  
FAX: (514)-896-4701  
Email: Renierg@ere.umontreal.ca

## SUMMARY

Low density lipoprotein (LDL) oxidation has been suggested to play a key role in the pathogenesis of atherosclerosis, a major complication of diabetes mellitus. Gliclazide, a second generation sulfonylurea, is widely used in the treatment of type II diabetes mellitus. Recently, a free radical scavenging activity of gliclazide has been reported. In the present study, we examined the effects of gliclazide on cell-mediated LDL oxidation and monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidatively modified LDL. Incubation of human monocytes and bovine aortic endothelial cells (BAE cells) with increasing concentrations of gliclazide (0-10 $\mu$ g/ml) and native LDL (100 $\mu$ g/ml) resulted in a dose-dependent diminution of cell-mediated LDL oxidation as assayed by the measure of thiobarbituric reactive substances. In addition exposure of BAE cells to gliclazide (0-10 $\mu$ g/ml) and native LDL (100 $\mu$ g/ml) induced a dose-dependent diminution of the oxidized LDL-induced monocyte adhesion to BAE cells as measured by the myeloperoxidase assay. The effects of glyburide, another second generation sulfonylurea, was also tested on cell-mediated oxidation of LDL and LDL-induced monocyte adhesion to the endothelium. No significant effect of this drug was observed on these two processes. These results, therefore, demonstrate that gliclazide is effective *in vitro*, in reducing both cell-mediated LDL oxidation and monocyte adhesion to the endothelium. These findings suggest a potential beneficial effect of gliclazide in the prevention of atherosclerosis in diabetic patients.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis occurs prematurely in diabetic individuals (1) and is considered to be the major complication of diabetes mellitus (2). Diabetic patients show increased levels of circulating modified lipoproteins (3) and enhanced oxidation of their plasma low-density lipoproteins (LDL) (4). Increased production of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation has also been found in erythrocyte membranes of diabetic patients (5). Moreover, the circulating levels of MDA are higher in the plasma of diabetic patients as compared with those observed in control subjects (6). LDL oxidation has been suggested to play a key role in atherogenesis associated with diabetes mellitus (7). The proatherogenic properties of oxidized LDL are likely to result from its biological functions. LDL, once oxidized, is avidly taken up by macrophages via the scavenger receptor, leading to the formation of foam cells in vitro (8-10). Oxidatively modified LDL is also toxic to endothelial cells (11) and alters both growth factor (12) and cytokine (13) production. Finally, it is chemotactic to human monocytes (14-15), inducing monocyte recruitment and adhesion to the endothelium in vitro (16), and promoting leucocyte-endothelial interactions in vivo (17). Enhanced binding of monocytes to the vasculature has been documented in diabetes (18). Since adherence of monocytes to the endothelium is one of the earliest events in the development of atherosclerosis, such alteration may represent one of the mechanisms leading to accelerated atherosclerosis in diabetic patients.

Gliclazide, a second-generation sulfonylurea, is widely used in the treatment of type II diabetic patients. Beside its metabolic effects (19), gliclazide possess some nonmetabolic effects specifically related to vascular disease in diabetes. Among them, free radical

scavenging activity of gliclazide has been recently documented (20). Based on this observation, we anticipated that gliclazide may reduce vascular cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced monocyte adhesion to endothelial cells. Our results demonstrate that gliclazide effectively reduces, in vitro, both cell-mediated LDL oxidation and monocyte adhesion to endothelium. These data suggest that treatment of diabetic patients with gliclazide may prevent or retard the development of atherosclerosis.



## MATERIAL AND METHODS

### Reagents

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) and L-glutamine were obtained from ICN Biochemicals Inc.(Costa Mesa, CA). RPMI-1640 was purchased from Gibco (Grand Island, NY), penicillin-streptomycin and foetal calf serum (FCS) were obtained from Flow Lab. (McLean, VA) and Hyclone Laboratories INC., (Logan, UT). Thiobarbituric acid (TBA) and tetraethoxypropane (TEP) were purchased from ICN Biochemicals Inc. (Costa Mesa, CA). Dianisidine dihydrochloride and hexadecyltrimethylamine ammonium bromide (HTAB) from Sigma chemicals (St -Louis, MO). Phosphoric acid and butanol were obtained from Fisher Scientific (Nepean, Ontario). Gliclazide and glyburide were kindly provided by les Laboratoires Servier (France) and Hoechst (Canada), respectively.

### Endothelial cell culture

Subcultured (17th passage) bovine aortic endothelial (BAE) cells were kindly provided by Dr R. Sauvé, Montreal University, Montreal. Cells were plated in tissue culture flasks at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere and grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 2mM glutamine. After 6 days, cells were trypsinized and cultured for additionnal 48 hours in 96

multiwells (Costar) at which time cell confluence was reached. In all experiments, cells were used between the 18th and the 23th passage.

#### Human monocyte isolation

Fresh heparinized blood (100ml) was obtained from healthy non smoker male and female donors. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll (Pharmacia) (21), were allowed to aggregate in presence of FCS, then further purified by rosetting technique. After density centrifugation, recovery of highly purified monocytes (85-90%) as assessed by FACS analysis was obtained. Monocytes were resuspended in serum free RPMI-1640 medium with 2mM glutamine supplemented with 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin and used immediately.

#### Human LDL isolation

LDL was isolated from plasma obtained from healthy normolipidemic human subjects. Venous blood was drawn into tubes containing EDTA and LDL was isolated at a density of 1.019 to 1.063 after sequential centrifugation in KBr according to the method of Hatch (22). LDL was extensively dialyzed for 24h at 4°C against 5mM Tris-50mM NaCl to remove EDTA, stored at 4°C and used within 2 days at a final concentration of 100 µg LDL protein/ml. Protein content in the LDL preparations was measured according to the Bradford method (23).

### Oxidative modification of LDL

- *Cell-free system*: Oxidation of LDL was performed by incubating native LDL (100 µg protein/ml) at 37°C for 20h in serum free RPMI-1640 containing 5µM CuSO<sub>4</sub>. Incubation was performed in the presence of increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml) or glyburide (0-5µg/ml). These concentrations were chosen because they are in the range of plasma levels in diabetic patients treated with these drugs.

- *Cell system*: Cellular modification of LDL was obtained by incubating 100 µg LDL protein for 20h at 37°C in the presence of human monocytes or BAE cells in serum-free RPMI-1640 containing 3µM CuSO<sub>4</sub>. To assess the effect of gliclazide or glyburide on cell-mediated LDL oxidation, cells were pretreated for 1h with increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml) or glyburide (0-5µg/ml) before the addition of LDL. At the end of the incubation period, supernatants were removed and EDTA (0.04% final concentration) was added to stop LDL oxidation.

### Determination of LDL oxidation

- *Thiobarbituric acid-reactive substances assay*: The lipid peroxide content of oxidized LDL was determined by measuring in the supernatant, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) expressed as MDA equivalents (nmoles/500µl medium) (24-25). Samples (500µl) were mixed with 3 ml of phosphoric acid (1%) and 1 ml of TBA (0.6%). The mixture was heated up to 95°C for 45 min in a hot water bath. After cooling down, the

MDA-TBA complex was extracted by adding butanol and the optical density was read at 532 nm. Freshly diluted TEP which produces MDA after hydrolysis was used as standard.

- *Electrophoretic mobility*: To assess In the cell-free system the electrophoretic mobility of copper ions-treated LDL, agarose gel electrophoresis of this lipoprotein was performed using the commercial paragon system (Beckman, Brea, CA).

#### Adhesion assay

The day of the experiment, confluent monolayers of BAE cells were incubated in serum-free RPMI-1640 supplemented with  $3\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  and treated with LDL ( $100\mu\text{g}$  protein/ml) for 20h at  $37^\circ\text{C}$ . At the end of the incubation period, supernatants were removed and fresh serum-free RPMI-1640 medium was added. One hundred  $\mu\text{l}$  of a monocytic cell suspension ( $2.8 \cdot 10^6$  cells/ml) was then added to each well. After a 30 min incubation period, non-adherent monocytes were removed by washing twice with phosphate buffer saline without calcium or magnesium (PBS-A). Adherent cells were lysed in  $50\mu\text{l}$  of HTAB (0.5%) in PBS-A at pH 6.0 for 30 min. Quantification of adherent monocytes was made by measuring monocyte myeloperoxidase (MPO) activity (26). Briefly, MPO activity was determined by the addition in each well of  $250\mu\text{l}$  of dianisidine dihydrochloride ( $0.2\text{mg/ml}$  in PBS-A) warmed up at  $37^\circ\text{C}$  and mixed with hydrogen peroxide ( $0.4\text{mM}$  final concentration). After 2-5 min of incubation the optical density of the plate wells was read at  $450\text{nm}$  using a Titertek multiscan spectrophotometer (Flow Laboratories). In order to test the effect of gliclazide or glyburide on monocyte adhesion to endothelium, BAE cells were

pretreated for 1 hour with increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml) or glyburide (0-5 µg/ml).

#### Determination of cell viability

To evaluate the cellular toxicity of gliclazide and glyburide at the maximal concentrations used, cell viability was estimated using trypan blue exclusion and was consistently found to be higher than 95%.

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed by one-way ANOVA analysis followed by the Tukey's Test. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### Effect of gliclazide on the oxidative modification of LDL induced by incubation with copper ions in a cell-free system

Incubation of native LDL (100µg protein/ml) with  $\text{Cu}^{2+}$  at a concentration of 5 µM for 20h at 37°C resulted in oxidative modification of LDL as reflected by the higher increase in net negative charge of  $\text{Cu}^{2+}$ -LDL as compared to native LDL (Fig.1, panel a) and by the significant increase in the TBARS content of the incubation medium (Table 1). Although the TBARS assay is an indirect measure of lipid peroxidation, it is a convenient and widely used method to assess LDL oxidation in both cell-free and cell-mediated systems. Addition of gliclazide, in the concentration range of 2.5-10µg/ml, decreased in a dose-dependent manner the formation of TBARS. Maximal inhibitory effect was observed with a concentration of 10µg/ml of gliclazide (Fig.1, panel b). At this concentration, TBARS content decreased by 18%. In contrast, addition of increasing concentrations of glyburide (0.05-5µg/ml) under similar experimental conditions, did not reduce TBARS formation in the medium (Table II). Since gliclazide and glyburide were dissolved in dichloromethane, the effects of this vehicle alone were also tested. As shown in Fig.1, panel b, incubation of LDL in presence of 20µg/ml dichloromethane did not affect the degree of LDL oxidation mediated by copper ions.

Effect of gliclazide on the oxidative modification of LDL mediated by human monocytes.

Incubation of native human LDL (100µg protein/ml) in medium containing 3 µM  $\text{Cu}^{2+}$  in the presence of freshly isolated human monocytes for 20h at 37°C enhanced significantly oxidative modification of LDL as measured by lipid peroxidation products in the supernatants (Table I). Medium TBARS content in the presence of monocytes was  $4.9 \pm 0.2$  MDA equivalents/500µl medium, while TBARS production in the absence of cells was  $2.3 \pm 0.3$  MDA equivalents/500µl medium ( $P < 0.005$ ). To evaluate the effects of gliclazide or glyburide on the degree of LDL oxidation mediated by human monocytes, these cells were incubated for 1h in presence of increasing concentrations (1-10µg/ml) of gliclazide or glyburide (0.05-5µg/ml) prior to the addition of native LDL. As shown in Figure 2, addition of gliclazide resulted in a dose-dependent inhibition of the degree of monocyte-induced LDL oxidation. The maximal decrease was about 20% and was observed at a concentration of 10µg/ml of this drug. In contrast, glyburide had no significant effect on the monocyte-induced LDL oxidation (Table II). Dichloromethane (10µg/ml) did not significantly affect monocyte-mediated LDL oxidation (data not shown).

Effect of gliclazide on the oxidative modification of LDL mediated by BAE cells.

Endothelial cells have the capacity to oxidize LDL in a similar way than human monocytes. Incubation of BAE cells with LDL (100µg protein/ml) for 20h led to a significant increase of the medium TBARS content (Table I) ( $3.9 \pm 0.2$  MDA equivalents/500µl medium) as compared to that observed in the absence of cells ( $1.8 \pm 0.3$

MDA equivalents/500 $\mu$ l medium) ( $P < 0.005$ ). Preincubation of endothelial cells with gliclazide (1-10 $\mu$ g/ml) for 1h prior to the addition of native LDL resulted in a significant decrease of the BAE cell-mediated oxidation of LDL (Fig.3). The inhibition of LDL oxidation by gliclazide was dose-dependent and maximal effect (18% decrease) was observed at 10 $\mu$ g/ml of this drug. Preincubation of BAE cells with glyburide (0.05-5 $\mu$ g/ml) was found to be ineffective to reduce LDL oxidation in the presence of BAE cells (Table II). As reported above, no effect of dichloromethane on BAE cell-mediated LDL oxidation was observed (data not shown).

#### Effect of gliclazide on monocyte adhesion to BAE cells

Preincubation of BAE cells with native LDL (100 $\mu$ g protein/ml) in presence of 3 $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  for 20h at 37°C resulted in a 2.7- fold increase in the number of adherent monocytes to the endothelium as assessed by the MPO assay (Table III). In presence of LPS (10ng/ml), used as positive control, monocyte adhesion to the BAE cells was enhanced by 2.3 fold (Table III). Pretreatment of BAE cells with gliclazide (1-10 $\mu$ g/ml) for 1h dramatically decreased the ability of oxidized LDL to stimulate BAE cells adhesiveness (Fig.4). Gliclazide-induced inhibition of monocyte adhesion to the endothelium was dose-dependent and at the highest concentration of gliclazide (10 $\mu$ g/ml), monocyte adherence to endothelial cells was decreased by 43% (Fig.4). Pretreatment of BAE cells with glyburide (0.5 $\mu$ g/ml) did not affect the LDL-induced enhancement of monocyte adhesion to the endothelium (data not shown). Finally, no effect of dichloromethane on monocyte adhesion to endothelial cells was observed (data not shown).



## DISCUSSION

Our study indicates that gliclazide is clearly an antioxidant and may also have other effects unrelated to its hypoglycemic effects. Indeed, gliclazide inhibits LDL oxidation induced by incubation with copper ions, monocytes or endothelial cells. Our observation that gliclazide inhibits the oxidation of LDL by copper, in an in vitro system, is in accordance with the finding of Luo and O' Brien who recently reported in the form of an abstract (27) that in vitro resistance of LDL to copper oxidation is increased in presence of gliclazide. These results suggest that the antioxidant activity of gliclazide may also be manifested in plasma compartment and/or in atherosclerotic plaques where catalytically active copper ions are present. In a cell-free system,  $\text{Cu}^{2+}$  promotes free radical-mediated LDL oxidation by generating hydroxy radicals such as peroxy or alkoxyl radicals (28). The reduced  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL in presence of gliclazide may suggest that this drug exerts its protective effect by metal chelation or alternatively by scavenging free radicals.

Previous in vitro studies have demonstrated that gliclazide is a general free radical scavenger (29). It has been suggested that the azabicyclo-octyl ring present in this sulphonylurea may be responsible for this property. This hypothesis is supported by our observation that glyburide which does not present this particular chemical structure is ineffective to reduce LDL oxidation. Free radical scavengers have been shown to inhibit the propagation of lipid peroxidation by breaking the chain of oxidative reactions. Such mechanism may account for the antioxidant action of vitamin E which inactivates peroxy radicals and of probucol which seems to prevent LDL oxidation by trapping hydroxyl radicals (30,31). Protective effect of LDL against oxidative modification has also been reported in presence of several other drugs, such as paracetamol (32) and dipyridamole (33).

Our results demonstrate that gliclazide inhibits  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL at 20h with the same order of potency than these drugs suggesting that similar mechanisms are used by these drugs to reduce metal ion-catalyzed free radical reactions.

In the case of monocyte-induced modification of LDL, the initiation of the oxidative process has been shown to be related, at least in some systems, to the secretion of the superoxide anion (34-36). In contrast, the subsequent propagation and amplification of the oxidative reactions have been ascribed to involve an superoxide-independent pathway (34-36). A role for cellular lipoxygenases in LDL modification by monocytes and macrophages has also been postulated (37, 38). In vitro, respiratory burst-dependent generation of superoxide is induced in activated monocytes and macrophages by specific particulate and non-particulate agents (39, 40). While incubation of LDL with activated human monocytes has been shown to result in dramatic LDL oxidation, no significant oxidation was reported in the supernatants of unactivated mononuclear cells incubated with LDL (34-36). These observations are at variance with our results which demonstrate a 2-fold increase in the concentration of lipid-peroxidation products in culture supernatants of resting human monocytes incubated with LDL as compared to that observed in cell free medium. Although the reasons for such discrepancy are unclear, activation of the cells resulting from the isolation procedures used in the present study does not seem to account for such effect. Indeed, the basal production of superoxide or tumor necrosis factor alpha by these cells was consistently found to be undetectable or very low (data not shown). Considering the controversy existing about the participation of the superoxide anion in human monocyte/macrophage-mediated oxidation of LDL (41-43), it may be hypothesized that, under our experimental conditions, LDL oxidation does not require superoxide. Recent

reports have proposed that these cells enhance the oxidation of LDL by enhancing the redox reaction of the metal ions present in the medium (44-46). The similar effectiveness of gliclazide to reduce LDL oxidation mediated by copper ions or monocytes suggests that most of the inhibitory effects of gliclazide we observed on monocyte-mediated LDL oxidation might be related to its ability to decrease metal-catalyzed propagation reactions. Alternatively, since 15-lipoxygenase may be responsible for cell-mediated oxidation of LDL, gliclazide may reduce LDL oxidation by reducing lipoxygenase activity.

Although aortic endothelial cells derived from different species have been found to modify LDL (47-50), several studies have suggested that BAE cells do not oxidize LDL (47, 49, 51, 52). However, in a recent study, Morgan et al found that BAE cells are effective to modify LDL, although they seem to require more time for doing so (53). Our results are in accordance with these data. Indeed, we observed a 2-fold increase of LDL oxidation after incubation of BAE cells with LDL in presence of copper ions as compared to that observed in cell free medium. While contradictory results leave unresolved the hypothesis that superoxide could mediate modification of LDL by cultured endothelial cells (48, 51), a role for endothelial cell lipoxygenase has been postulated in the oxidative modification of LDL by endothelial cells (37, 49). Since BAE cells produce little superoxide and have high levels of superoxide dismutase and catalase, one important mechanism in BAE cell-induced LDL oxidation may involve cellular lipoxygenases. Our results demonstrate that BAE cells exposed to gliclazide have a reduced capacity to oxidize LDL. Although the maximal protective effect of gliclazide is similar in endothelial cells and human monocytes, BAE cells exhibit less sensitivity to gliclazide than monocytes. Such difference in the sensitivity of the two systems to gliclazide might be interpreted in

view of the fact that different mechanisms are involved in LDL oxidation. Although the mechanism(s) by which gliclazide might protect LDL from BAE cell-promoted oxidation are unknown, the low rate of superoxide production by BAE cells may suggest that gliclazide may exert its antioxidative properties by reducing endothelial cell lipoygenase activity.

Oxidized LDL has been shown to enhance monocyte adhesion to the vascular endothelium (16). In accordance with these observations, our results demonstrate that BAE cell-induced LDL oxidation is associated with a significant increase in monocyte adhesion to the endothelium. A similar observation was made by Haller et al who recently reported that exposure of human endothelial cells to native or acetylated LDL led to an increase of monocyte adhesion (54). The antioxidative properties of gliclazide may be at least partly responsible for the inhibitory effect of this drug on modified LDL-induced human monocyte adhesion. Conversely, the lack of antioxidant action of glyburide may explain its ineffectiveness to reduce the LDL-induced enhancement of monocyte adhesion to the endothelium. Three adhesion molecules, VCAM-1, ELAM-1 and ICAM-1, and especially the former two, might be involved in the oxidized LDL-induced adhesiveness of endothelial cells to monocytes (54, 55). Therefore, the inhibitory effects of gliclazide on modified LDL-stimulated adhesion of monocytes to the endothelium may involve a reduction of these adhesion molecule expression at the surface of the endothelial cells. This hypothesis awaits further studies to be tested.

In conclusion, these data provide evidence for a specific inhibitory effect of gliclazide on LDL oxidation and LDL-stimulated adhesion of monocytes to the endothelium. These results suggest that treatment of diabetic patients with gliclazide may

attenuate in vivo LDL oxidation and monocyte adhesion to the endothelium. Such effects could be beneficial in the prevention and treatment of accelerated atherosclerosis associated with diabetes.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Les Laboratoires Servier for financial support.

**TABLE I. GENERATION OF TBARS BY COPPER IONS, MONOCYTES AND BAE CELLS.**

	COPPER IONS		MONOCYTES		BAE CELLS	
	-	+	-	+	-	+
TBARS (nmoles/500 $\mu$ l)	0.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1***	2.3 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.2***	1.8 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.2***

Data represent the mean  $\pm$  SEM of 7 different experiments. \*\*\*, P < 0.005.

**TABLE II. EFFECT OF GLYBURIDE ON THE GENERATION OF TBARS BY COPPER IONS, MONOCYTES AND BAE CELLS.**

<b>GLYBURIDE</b>	<b>5 <math>\mu</math>M CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Monocytes</b>	<b>BAE cells</b>
<b>(<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>(without cells)</b>	<b>+ 3 <math>\mu</math>M CuSO<sub>4</sub></b>	<b>+ 3 <math>\mu</math>M CuSO<sub>4</sub></b>
0	100 $\pm$ 4.9	100 $\pm$ 2.5	100 $\pm$ 4.4
0.05	94 $\pm$ 0.6	101 $\pm$ 4.2	115 $\pm$ 5.8
0.13	97 $\pm$ 2.9	104 $\pm$ 1.8	105 $\pm$ 3.8
0.25	95 $\pm$ 1.7	96 $\pm$ 8.6	103 $\pm$ 3.5
0.5	93 $\pm$ 1.5	104 $\pm$ 2.6	103 $\pm$ 1.4
5	96 $\pm$ 0.9	96 $\pm$ 4.3	112 $\pm$ 6.9

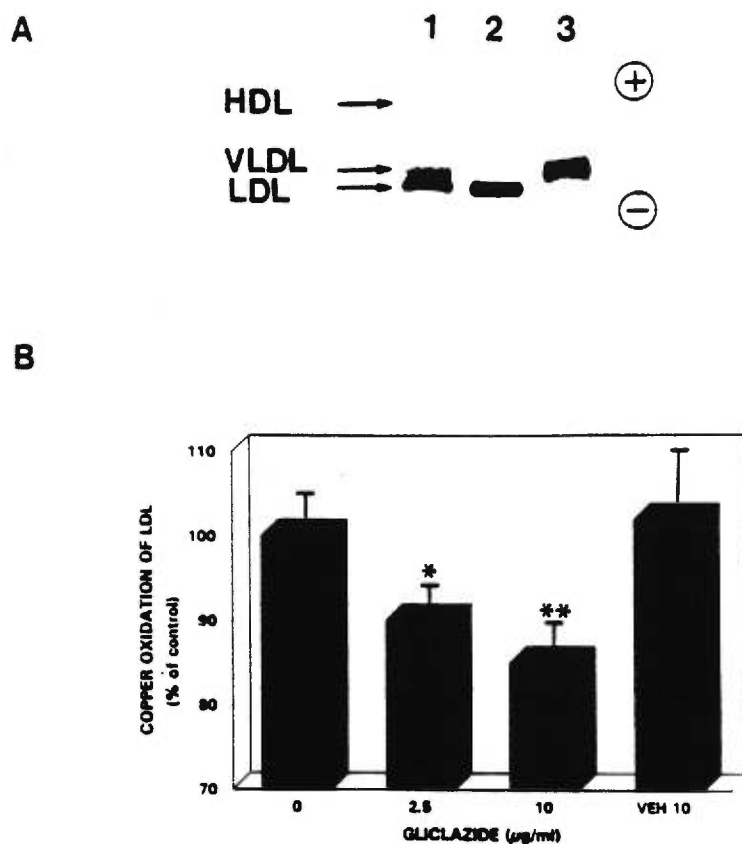
Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 experiments.

**TABLE III. MONOCYTE ADHESION TO BOVINE AORTIC ENDOTHELIAL CELLS.**

	<b>ADHESION (% over basal values)</b>
<b>Control (without LDL)</b>	100 ± 10
<b>LDL + 3 μM CuSO<sub>4</sub></b>	280 ± 20 **
<b>LPS (10ng)</b>	230 ± 20**

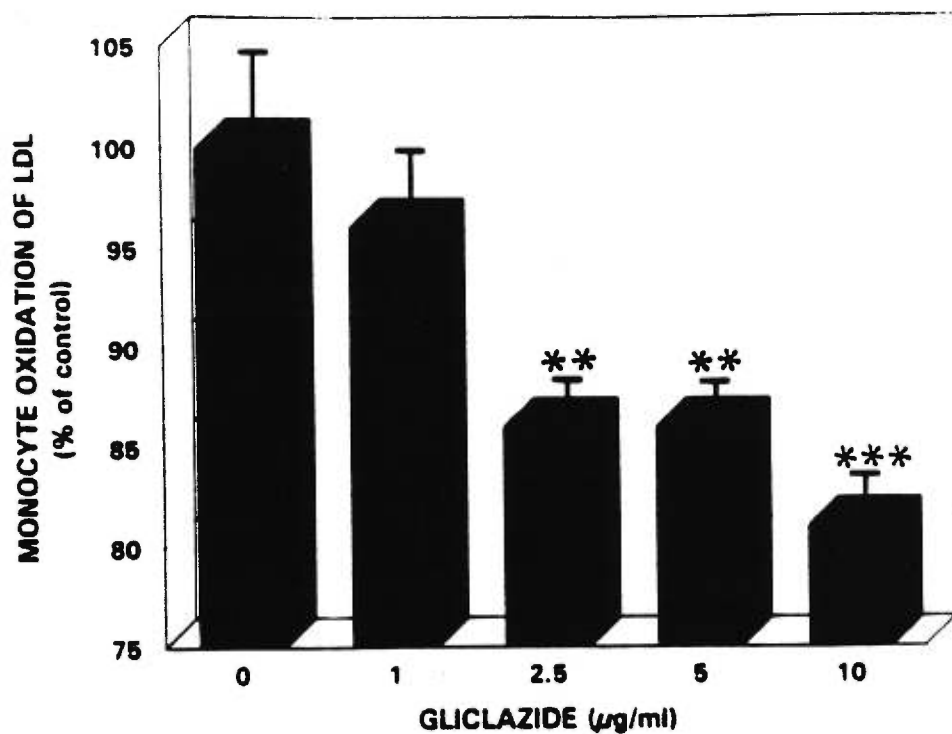
Data represent mean ± SEM of 6 experiments. \*\*, P < 0.01 vs control.





**Fig 1. Panel a:** Electrophoretic mobility of human normolipidemic plasma (lane 1), native LDL (lane 2) and copper ion-treated LDL. Lipoproteins were separated in a 0.5% agarose gel and stained with Sudan Black.

**Panel b:** Gliclazide decreases in a dose-dependent manner LDL oxidation in a cell-free system. Native LDL (100 µg/ml) were incubated for 20 hours in RPMI containing 5 µM CuSO<sub>4</sub> with increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml). At the end of the incubation period, TBARS content was measured in the medium. Results were expressed as % TBARS content observed in the absence of gliclazide. Data represent the mean ± SEM of 6 different experiments. \*, P < 0.05, \*\* P < 0.02 vs control.



**Fig 2.** Gliclazide decreases in a dose-dependent manner LDL oxidation mediated by human monocytes. Native LDL (100 µg/ml) were incubated for 20 hours with human monocytes in RPMI containing 3 µM CuSO<sub>4</sub> in the presence of increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml). At the end of the incubation period, TBARS content was measured in the medium. Results were expressed as % TBARS content observed in the absence of gliclazide. Data represent the mean ± SEM of 7 different experiments. \*\*, P < 0.02, \*\*\*, P < 0.005 vs control.

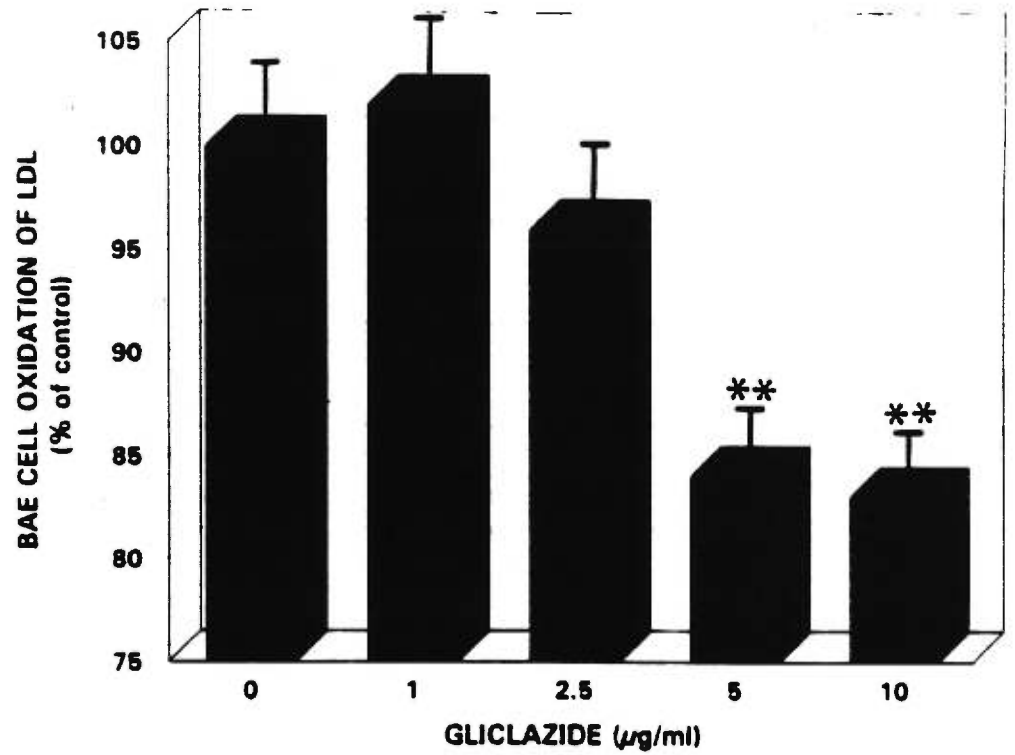


Figure 3.

Gliclazide decreases in a dose-dependent manner LDL oxidation mediated by bovine aortic endothelial cells. Native LDL (100 µg/ml) were incubated for 20 hours with BAE cells in RPMI containing 3 µM CuSO<sub>4</sub> in the presence of increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml). At the end of the incubation period, TBARS content was measured in the medium. Results were expressed as % TBARS content observed in the absence of gliclazide. Data represent the mean ± SEM of 7 different experiments. \*\*, P < 0.02 vs control.

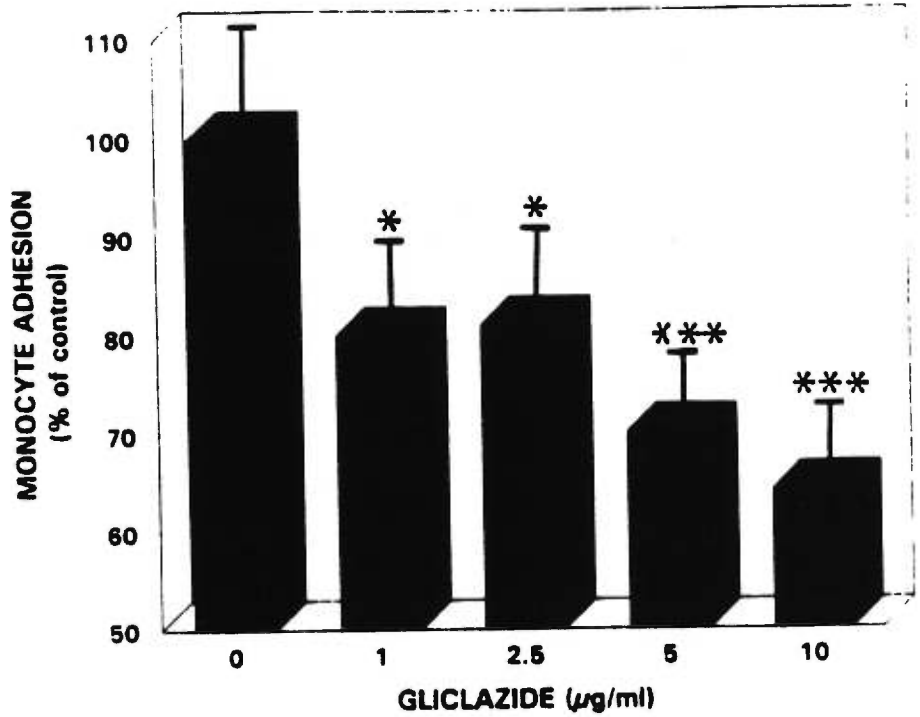


Figure 4.

Gliclazide decreases in a dose-dependent manner monocyte adhesion to BAE cells induced by oxidized LDL. Endothelial cells were treated for 20 hours with native LDL (100 µg/ml) in the presence of increasing concentrations of gliclazide (0-10 µg/ml). Monocyte adhesion to endothelial cells was measured by the MPO assay. Results were expressed as % of control. Data represent mean ± SEM of 7 different experiments. \*, P < 0.05 \*\*, P < 0.01, \*\*\* P < 0.005 vs control.

**REFERENCES**

1. Nathan DM: Long-term complications of diabetes mellitus *N Engl J Med* 328:1676-1685, 1993
2. Steiner C: Atherosclerosis, the major complication of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 189:277-297, 1985
3. Stewart MW, Laker MF, Dyer RG, Game F, Mitcheson J, Winocour PH, Alberti KGMM : Lipoprotein compositional abnormalities and insulin resistance in type II diabetic patients with mild hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 13:1046-1052,1992
4. Baynes JW: Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991
5. Nagasaka Y, Fuji S, Kanako T: Effects of high glucose and sorbitol pathway on lipid peroxidation of erythrocytes. *Horm Metab Res* 19:89-90, 1987
6. Nishigaki I, Hagihara M, Tsunekawa H, Maseki M, Yagi K: Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med* 25:373-378,1991
7. Chisolm GM, Irwin KC, Penn MS: Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes* 41:61-66, 1992
8. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-923, 1989
9. Steinbrecher UP, Zhang H, Lougheed M: Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free radical biol & Med* 9:155-168, 1990

10. Heinecke JW: Cellular mechanisms for the oxidative modification of lipoproteins: implication for atherogenesis. *Coronary Artery Dis* 5:205-210, 1994
11. Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Asai K, Kuzuya F: Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1096:155-161, 1991
12. Fox PL, Chisolm G, DiCorleto PE: Lipoprotein-mediated inhibition of endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein depends on free radical lipid peroxidation. *J Biol Chem* 262:6046-6054, 1987
13. Hamilton TA, Guoping MA, Chisolm GM: Oxidized low-density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 144:2343-2350, 1990
14. Cushing S, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5134-5138, 1990
15. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and monocyte-macrophage chemotactic factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 344:254-257, 1990
16. Quinn MTS, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D: Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* 84:2995-2998, 1987

17. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Ai Kim J, Bamshad B, Esterson M, Fogelman: Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 85:1260-1266, 1990
18. Kim AJ, Berliner JA, Natarajan RD, Nadler JL: Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes* 43:1103-1107, 1994
19. Chiasson JL, Hamet P, Verdy M: The effect of Diamicon on the secretion and action of insulin. *Diabetes Res Clin Pract* 14:S47-S52, 1991
20. Jennings PE, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JFF: Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetic patients: clinical assessment. *Metabolism* 41:36-39, 1992
21. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 97:77-89, 1968
22. Hatch FT: Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* 6:1-68, 1968
23. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
24. Mihara M, Uchiyama M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271-278, 1978

25. Csallany AS, Der Guan M, Manwaring JD, Addis PB: Free malonaldehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 142:277-283, 1984
26. Bath PMW, Booth RFG, Hassall DG: Monocyte-lymphocyte discrimination in a new microtitre-based adhesion assay. *J Immunol Methods* 118:59-65, 1989
27. Luo M and O'Brien RC: Antioxidant effects of sulphonylureas. *Diabetes* 45:123A, 1996
28. Thomas CE and Jackson RL: Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent and -independent oxidation of low density lipoproteins. *J Pharmacol Exp Ther* 256:1182-1188, 1991
29. Scott NA, Jennings PE, Brown J, Belch JFF: Gliclazide: a general free radical scavenger. *Eur J Pharmacol* 208:175-177, 1991
30. Aviram M: Oxidative modification of low density lipoprotein and its relation to atherosclerosis. *Isr J Med Sci* 31:241-249, 1995
31. Hoffman RM, Garewal HS: Antioxidants and the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 155:241-246, 1995.
32. Nenseter MS, Halvorsen B, Rosvold O, Rustan AC and Drevon CA: Paracetamol inhibits copper ion-induced, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of LDL. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 15:1338-1344, 1995
33. Selley ML, Czeti AL, McGuinness JA, Ardlie NG: Dipyridamole inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 111:91-97, 1994



34. Hiramastu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A: Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 7:55-60, 1987
35. Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A: Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 77:757-761, 1986
36. Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisolm III GM: Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol* 142:1963-1969, 1989
37. Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D: A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1046-1050, 1989
38. McNally AK, Chilsom GM, Morel DW, Cathcart MK: Activated human monocytes oxidize low-density lipoprotein by a lipoxygenase-dependent pathway. *J Immunol* 145:254-259, 1990
39. Bellavite P: The superoxide forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad Biol Med* 4:225-261, 1988
40. Cheson BD, Curnutte JT, Babior BM: The oxidative killing mechanism of the neutrophil. *Progress in Clinical Immunology* 3:1-65, 1977
41. Garner B, Dean RT and Jessup W: Human macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein is delayed and independent of superoxide production. *Biochem J* 301:421-428, 1994

42. Jessup W, Simpson JA and Dean RT: Does superoxide radical have a role in macrophage-mediated oxidative modification of LDL? *Atherosclerosis* 99:107-120, 1993
43. Wilkins GM, Leake DS: The effects of inhibitors of free radical generating-enzymes on low-density lipoprotein oxidation by macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1211:69-78, 1994
44. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA and Chait A: The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells *J Biol Chem* 262:10098-10103, 1987
45. Sparrow CP, Olszewski J: Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions. *J Lipid Res* 34:1219-1228, 1993
46. Kritharides L, Jessup W and Dean RT: Macrophages require both iron and copper to oxidize low-density lipoprotein in hanks'balanced salt solution. *Arch Biochem Biophys* 323:127-136, 1995
47. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6499-6503, 1981
48. Van Hinsbergh VWM, Schefer M, Havekes L, Kemper HJM: Role of endothelial cells and their products in the modification of low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 878:49-64, 1986

49. Derian CK, Lewis DF: Activation of 15-lipoxygenase by low density lipoprotein in vascular endothelial cells. Relationship to the oxidative modification of low density lipoprotein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45:49-57, 1992
50. Kalant N, McCormick S, Parniak MA: Effects of copper and histidine on oxidative modification of low density lipoprotein and its subsequent binding to collagen. *Arterioscler Thromb* 11:1322-1329, 1991
51. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arterioscler Thromb* 4:357-364, 1994
52. Steinbrecher UP: Role of superoxide in endothelial-cell modification of lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 959:20-30, 1988
53. Morgan J, Smith JA, Wilkins GM, Leake DS: Oxidation of low density lipoprotein by bovine and porcine aortic endothelial cells and porcine endocardial cells in culture. *Atherosclerosis* 102:209-216, 1993
54. Haller H, Schaper D, Ziegler W, Philipp S, Kuhlmann M, Distler A, Luft FC: Low-density lipoprotein induces vascular adhesion molecule expression on human endothelial cells. *Hypertension* 25:511-516, 1995
55. Yue TL, Wang X, Gu JL, Ruffolo Jr RR, Feuerstein GZ: Carvedilol prevents low-density lipoprotein (LDL)-enhanced monocyte adhesion to endothelial cells by inhibition of LDL oxidation. *Eur J Pharmacol* 294:585-591, 1995

Diabetes Care, in press

**Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion and tumor necrosis factor alpha production in NIDDM patients following gliclazide treatment.**

Anne-Cécile Desfaits, MSc, Omar Serri MD, PhD and Geneviève Renier MD, PhD.

Metabolic Unit, CHUM Research Center, Notre-Dame Pavilion and Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Canada.

Running title: Antioxidant effect of gliclazide in NIDDM patients.

Key words: Oxidative stress, monocyte adhesion, adhesion molecules, cytokines, gliclazide.

Reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier  
CHUM Research Center  
Notre-Dame Pavilion  
3rd floor, J.A de Sève, Y-3622  
1560 Sherbrooke Street East  
Montreal, Quebec, H2L 4M1  
Phone:(514)-281-6000 #6895  
FAX: (514)-896-4701  
Email: Renierg@ere.umontreal.ca

**OBJECTIVES** - We evaluated the effect of gliclazide administration to NIDDM patients on 1) monocyte adhesion to cultured endothelial cells (ECs) 2) plasma cytokine and lipid peroxide levels and 3) monocyte cytokine production.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS** - Poorly controlled glyburide-treated diabetic patients (n=8) and healthy control subjects (n=8) were recruited. At the beginning of the study, glyburide was replaced by an equivalent hypoglycemic dose of gliclazide. Serum and monocytes were isolated from blood obtained from control and diabetic subjects before and after 3 months of treatment with gliclazide.

**RESULTS** - Plasma lipid peroxide levels and monocyte adhesion to ECs are enhanced in NIDDM patients and gliclazide administration totally reverses these abnormalities. Before gliclazide treatment, serum levels of cytokines did not differ in the control and the diabetic groups, with the exception of an enhancement of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in NIDDM subjects. Basal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated monocyte production of interleukin-1 $\beta$ , IL-6 and interleukin-8 did not differ between the two groups. Furthermore, basal monocyte production of TNF $\alpha$  was similar in the control and the diabetic groups, whereas a marked increase in the LPS-stimulated monocyte production of TNF $\alpha$  was observed in the NIDDM group. Gliclazide treatment lowered LPS-stimulated TNF $\alpha$  production by diabetic monocytes to levels similar to those observed in control subjects.

**CONCLUSIONS** - Gliclazide administration to NIDDM patients inhibits the increased adhesiveness of diabetic monocytes to ECs and reduces the production of  $\text{TNF}\alpha$  by these cells. These results suggest that treatment of NIDDM subjects with gliclazide may be beneficial in the prevention of atherosclerosis associated with NIDDM.

## INTRODUCTION

Several lines of evidence implicate oxidatively modified low density lipoproteins (LDL) in atherogenesis (1,2). Alteration of LDL by oxidative process results in their unregulated uptake by macrophages leading to foam cell formation (3,4,5). Oxidized LDL also increase the expression of cell adhesion molecules enhancing thereby endothelial cell (EC) adherence of mononuclear cells (6,7). Finally, modified LDL enhance the production of several proatherogenic factors, including growth factors (8) and cytokines (9). Non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) is closely associated with the development of accelerated atherosclerosis (10). Diabetic patients show increased levels of circulating modified lipoproteins (11) and enhanced oxidation of their plasma LDL (11,12). Increased lipoprotein oxidation in diabetes mellitus (or in states of chronic hyperglycemia) may be responsible for the previously documented increase in the expression of circulating adhesion molecules (13) and in the production of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) (14,15), a key mediator of insulin resistance (16), in NIDDM subjects.

Gliclazide, a second-generation sulfonylurea, is widely used in the treatment of NIDDM patients. Beside its metabolic effects (17), gliclazide possesses some nonmetabolic effects specifically related to vascular disease in diabetes. Recently, a free radical scavenging activity of this drug has been reported (18). We have previously shown that gliclazide reduced in vitro, vascular cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced monocyte adhesion to cultured ECs (19). Based on these findings, we evaluated in the present study the effect of gliclazide administration to NIDDM subjects on serum lipid peroxide levels, monocyte adhesion and monocyte-mediated LDL oxidation. We also

measured serum and monocyte-derived cytokine levels in NIDDM patients before and after gliclazide treatment.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Subjects

The study group comprised 8 NIDDM patients and 8 healthy control subjects. The patients, 4 women and 4 men, with NIDDM gave written consent to participate in this study, which was approved by the Notre-Dame Hospital Research and Ethics committees. All patients were selected, from our diabetic outpatient clinic, for poor diabetes control due to lack of adherence to dietary regimes (glycated hemoglobin of 9% or more), glyburide treatment, no decompensated cardiac or renal conditions and non smoking. Their mean  $\pm$  SD (range) age was  $61 \pm 5$  years (55-70), BMI  $29 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup> (26-34), duration of NIDDM  $10 \pm 9$  years (3-30), glycated hemoglobin  $12 \pm 1\%$  (9.2-15) and daily glyburide dose  $16.5 \pm 5.8$  mg (5-20). All were also treated with metformin. None of the patients were primarily insulin dependent. One of them was a candidate for insulin substitution and was switched at the end of this study from gliclazide to insulin. Four patients were hypertensive and treated with ACE inhibitors, 4 were hypertriglyceridemic, 2 had macroangiopathy and 5 had microangiopathy (retinopathy or microalbuminuria). Control subjects, matched with patients for sex and BMI, were recruited from the Hospital Staff and relatives. Since age does not influence the variables under study (20, 21), control subjects and patients were not matched for age. Subjects with infectious or inflammatory conditions or treated by antiinflammatory or antioxidant drugs were excluded from the study. In this pilot study,



NIDDM patients were switched for 3 months from glyburide to an equivalent hypoglycemic dose of gliclazide (5 mg of glyburide equivalent to 80 mg of gliclazide). Venous blood samples were obtained from control subjects and from NIDDM patients before and after 3 months of treatment with gliclazide.

### Reagents

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) and L-glutamine were obtained from ICN Biochemicals Inc.(Costa Mesa, CA). RPMI-1640 was purchased from Gibco (Grand Island, NY), penicillin-streptomycin and foetal calf serum (FCS) were obtained from Flow Lab. (McLean, VA) and Hyclone Laboratories Inc.(Logan, UT), respectively. Thiobarbituric acid (TBA) and tetraethoxypropane (TEP) were purchased from ICN Biochemicals Inc. (Costa Mesa, CA). Dianisidine dihydrochloride and hexadecyltrimethylamine ammonium bromide (HTAB) were purchased from Sigma chemicals (St -Louis, MO). Phosphoric acid and butanol were obtained from Fisher Scientific (Nepean, Ontario). Gliclazide was kindly provided by les Laboratoires Servier (Neuilly, France).

### Human monocyte isolation

Fresh heparinized blood (100 ml) was obtained from fasted healthy non smokers male and female donors and from NIDDM patients. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll (Gibco-BRL, Grand Island, NY) (22), allowed to aggregate in presence of FCS, then further purified by rosetting technique. After density centrifugation, recovery of highly purified monocytes (85-90%) as assessed by

FACS analysis was obtained. Monocytes were resuspended in serum free RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and used immediately for adhesion assays or culture experiments.

#### Culture of human monocytes

Human monocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in 24-well multidishes (Nunc) in RPMI-1640 medium without FCS at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. The incubation was carried out for 24 hours in the presence or absence of 10 ng/ml LPS. At the end of the incubation period, cell supernatants were collected for measurements of cytokine production.

#### Human LDL isolation

LDL was isolated from plasma obtained from healthy normolipidemic human subjects. Venous blood was drawn into tubes containing EDTA and LDL was isolated at a density of 1.019 to 1.063 after sequential centrifugation in KBr according to the method of Hatch (23). LDL was extensively dialyzed for 24h at 4°C against 5 mM Tris-50 mM NaCl to remove EDTA, stored at 4°C and used within 2 days at a final concentration of 100 µg LDL protein/ml. Protein content in the LDL preparations was measured according to the Bradford method using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, Ont.).

#### Oxidative modification of LDL

Cellular modification of LDL was obtained by incubating 100 µg LDL protein for 20h at 37°C in presence of human control or diabetic monocytes in serum-free RPMI-1640

containing 3  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . At the end of the incubation period, supernatants were removed and EDTA (0.04% final concentration) was added to stop LDL oxidation.

#### Determination of serum lipid peroxides and LDL oxidation

The lipid peroxide content of oxidized LDL and serum was determined by measuring in the serum or supernatants the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmoles/500 $\mu\text{l}$  medium) (24,25). Samples (500 $\mu\text{l}$ ) were mixed with 3 ml of phosphoric acid (1%) and 1 ml of TBA (0.6%). The mixture was heated up to 95°C for 45 min in a hot water bath. After cooling down, the MDA-TBA complex was extracted by adding butanol and the optical density was read at 532 nm. Freshly diluted TEP which produces MDA after hydrolysis was used as standard.

#### Endothelial cell culture

Subcultured (17th passage) bovine aortic endothelial (BAE) cells were kindly provided by Dr R. Sauvé, Montreal University, Montreal. Cells were plated in tissue culture flasks at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ /95% air atmosphere and grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin and 2 mM glutamine. After 6 days, cells were trypsinized and cultured for additional 48 hours in 96 multiwells (Costar) at which time cell confluence was reached. In all experiments, cells were used between the 18th and the 23th passage.

### Monocyte adhesion assay

The day of the experiment, the medium of confluent monolayers of BAE cells was removed and replaced by fresh serum-free RPMI-1640 medium. One hundred  $\mu\text{l}$  of a monocytic cell suspension ( $2.3 \cdot 10^6$  cells/ml) was then added to each well. After a 30 minutes incubation period, non-adherent monocytes were removed by washing twice with phosphate buffer saline without calcium or magnesium (PBS-A). Adherent cells were lysed in 50  $\mu\text{l}$  of HTAB (0.5%) in PBS-A at pH 6.0 for 30 min. Quantification of adherent monocytes was made by measuring monocyte myeloperoxidase (MPO) activity (26). Briefly, MPO activity was determined by the addition to each well of 250  $\mu\text{l}$  of dianisidine dihydrochloride (0.2 mg/ml in PBS-A) warmed up at 37°C and mixed with hydrogen peroxide (0.4 mM final concentration). After 2-5 min of incubation the optical density of the plate wells was read at 450nm using a Titertek multiscan spectrophotometer (Flow Laboratories).

### Measurements of serum adhesion molecules levels

Serum adhesion molecules levels were measured by ELISA, using commercial kits purchased from R&D systems (Minneapolis, MN).

### Measurements of serum and monocyte cytokines levels

Serum cytokines levels and monocyte cytokines production were measured by ELISA, using commercial kits (R&D systems, Minneapolis, MN). Serum growth factors were measured by ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) and serum insulin-like growth

factor (IGF-1) levels were quantified using a highly sensitive and specific radioimmunoassay (Diagnostic Systems Labs, Webster, TX).

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed by one-way ANOVA analysis followed by the Tukey's Test. The Spearman rank correlation test was used to evaluate correlation between lipid peroxides levels and monocyte adhesion to cultured endothelial cells. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## **RESULTS**

#### Serum lipid peroxides levels in controls and diabetic patients

Serum lipid peroxides levels of NIDDM patients before gliclazide administration were  $9.6 \pm 1.1$  nmol/ml as compared to  $5.8 \pm 0.6$  nmol/ml in control subjects ( $P < 0.005$ ) (Table 1). After 3 months of gliclazide treatment, lipid peroxides levels were reduced in the NIDDM group to levels similar to those observed in the control group (Table 1).

#### Monocyte-mediated LDL oxidation in controls and diabetic patients

To evaluate the role of monocytes in the enhanced lipoprotein oxidation associated with NIDDM, we measured the in vitro ability of control and diabetic monocytes to oxidize LDL. Our results showed that monocyte-mediated LDL oxidation, as assessed by the TBARS assay, did not differ between the control and the diabetic groups neither before nor after gliclazide administration.

### Control and diabetic monocyte adhesion to cultured endothelial cells (ECs)

To assess the adhesiveness of diabetic monocytes to the endothelium, we measured the adhesion of control and diabetic monocytes to BAE cells. A marked increase in the adhesion of diabetic monocytes to ECs was observed before gliclazide treatment ( $163 \pm 24\%$  over control values,  $P < 0.005$ ) (Fig. 1). This increase was positively correlated ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.01$ ) with enhanced lipid peroxide levels observed in diabetic patients. Gliclazide administration totally reversed this anomaly, lowering monocyte adhesion in NIDDM patients to levels identical to those observed in control subjects (Fig. 1).

### Serum levels of soluble adhesion molecules

Serum levels of E-selectin (ELAM-1), intercellular cell adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) were determined in NIDDM patients and control subjects. There was no significant difference in the serum concentrations of ICAM-1 and VCAM-1 between the two groups, whereas serum levels of ELAM-1 were significantly higher in NIDDM patients, compared to those in control subjects ( $P < 0.005$ ) (Fig. 2).

Before treatment, there was no correlation between serum ELAM-1 levels and HbA1c ( $r = 0.18$ ), nor between ELAM-1 and monocyte adhesion ( $r = 0.15$ ). In contrast, lipid peroxide levels, serum TNF $\alpha$  concentrations and serum IL-6 levels positively correlated with ELAM-1 plasma concentrations ( $r = 0.73$ ,  $0.79$  and  $0.74$ , respectively,  $P < 0.01$ ). Gliclazide treatment had no effect on ELAM-1, ICAM-1 or VCAM-1 levels (Fig. 2).

### Serum levels of cytokines and growth factors in controls and diabetic patients

Serum TNF $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin (IL-6) levels were measured in NIDDM patients before and after gliclazide administration, and in controls. Before gliclazide administration, diabetic patients had higher serum TNF $\alpha$  levels ( $1.28 \pm 0.08$  pg/ml vs  $1.01 \pm 0.06$  pg/ml,  $P < 0.01$ ) and IL-6 concentrations ( $3.37 \pm 0.64$  pg/ml vs  $0.99 \pm 0.16$  pg/ml) than control subjects (Table 2). These concentrations were not significantly modified by gliclazide treatment. At variance, no significant differences were observed in the serum levels of IL-1 $\beta$ , IGF-I, vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) and transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) between the control and the diabetic groups (Table 2).

### Monocyte cytokines production in controls and diabetic patients

The basal and LPS-stimulated production of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and interleukin-8 (IL-8) by control and diabetic monocytes were next examined. Basal and LPS-stimulated production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 did not differ significantly between the control and the diabetic groups (Fig. 3a and Fig. 3b). In addition, there was no significant difference in the basal release of TNF $\alpha$  by monocytes isolated from NIDDM patients as compared to that observed in controls subjects (Fig. 4a). However, LPS-stimulated TNF $\alpha$  production was significantly higher in the diabetic group before gliclazide administration than in the control group (Fig. 4b). Moreover, the enhanced LPS-stimulated TNF $\alpha$  release by diabetic monocytes was significantly reduced by gliclazide treatment to levels similar to control values (Fig. 4b).

## CONCLUSIONS

Increased blood levels of lipid peroxidation products (11) and enhanced susceptibility to oxidation of plasma lipoproteins (12) have been reported in NIDDM subjects. In accordance with the results of Jennings et al. (18), our data demonstrate that gliclazide administration to NIDDM patients induces a significant reduction of plasma lipid peroxides levels in these subjects. These data together with the demonstration that gliclazide in vitro decreases copper-induced LDL oxidation (19) and increases the resistance of LDL to copper oxidation (27), suggest that the in vivo antioxidant effect of gliclazide could be related to its free radical scavenging properties.

Because human monocytes induce LDL oxidation, increased plasma lipid peroxides levels in diabetic patients may result from enhanced monocyte-mediated oxidation of LDL. Our results which demonstrate that LDL oxidation mediated by control or diabetic monocytes yields similar levels of TBA reactivity suggest that monocytes are not important determinants of plasma LDL oxidation in diabetes mellitus.

Enhanced adhesion of monocytes to cultured ECs has been documented in insulin-dependent diabetes mellitus patients (28). The present study demonstrates that monocytes isolated from NIDDM patients also bind to a greater extent to ECs than control cells do. Since oxidized LDL and hyperglycemia both enhance the adhesion of monocytes to cultured ECs (7,29,30), these metabolic alterations may account for the enhanced diabetic monocyte binding. Our findings that lipid peroxides levels positively correlate with the degree of monocyte adhesiveness to endothelium in NIDDM patients and that gliclazide totally reverses the enhancement of both lipid peroxides and monocyte adhesion to BAE cells in these subjects suggest a key role of lipid peroxidation in the increased monocyte



adhesiveness in NIDDM patients. While the antioxidant properties of gliclazide seem to be related to the presence of an azabicyclo-octyl ring in this sulphonylurea (31), the molecular mechanisms by which this antioxidant drug inhibits monocyte adhesion remain to be determined. One possible mechanism would be an effect of gliclazide on some adhesion molecules expressed on the monocytic cell surface. Overexpression of CD11b/CD18 (Mac-1) has been documented in diabetic monocytes (32). Pentoxifylline treatment reduces this enhanced antigen expression and decreases monocyte binding to endothelium (28). Modified LDL has been identified as one major determinant of CD11b overexpression at the monocyte cell surface (33) and gliclazide inhibits the enhancement of monocyte adhesion to ECs induced by oxidized LDL (19). Based on these findings, one may speculate that gliclazide, by its antioxidant properties may inhibit the adhesion of diabetic monocytes by reducing the CD11b expression at the monocyte cell surface.

Elevated plasma levels of cell adhesion molecules have been linked to the development of atherosclerosis in diabetic subjects (34). Oxidative stress may represent in these patients one important determinant of enhanced expression of cell adhesion molecules. Indeed, evidences exist that modified LDL increases cytokine-activated VCAM-1 gene expression in human ECs (35) and that enhanced circulating ICAM-1 levels are positively correlated with blood levels of MDA in NIDDM (36). In accordance with the results of Comanicini et al. (37-38), our data demonstrate in diabetic patients a dramatic increase in plasma ELAM-1 concentrations and a positive correlation between circulating ELAM-1 levels and serum lipid peroxides. Although our observations that plasma ELAM-1 concentrations also positively correlate with other parameters of oxidative stress such as TNF $\alpha$  and IL-6 seem to support a role of oxidative stress in the regulation of

ELAM-1 expression, our finding that gliclazide decreases peroxide levels without affecting ELAM-1 clearly indicates that oxidative stress is not the sole determinant of ELAM-1 levels. It has been previously suggested that glucose may play a key role in the regulation of ELAM-1 expression (37-40). In accordance with the study of Steiner et al (41), our data failed to correlate soluble concentration of ELAM-1 with glycemic control. Overall, these results clearly indicate that further studies are needed to establish the relationship between metabolic factors and soluble ELAM-1 levels in diabetic subjects.

Clinical and experimental data support a major role of the immune system in the development of atherosclerosis associated with diabetes. While long-term experimental diabetes has been found to be associated with enhanced serum TNF $\alpha$  activity (42), elevated serum TNF $\alpha$  levels have recently been documented in NIDDM patients (15,43). Increased serum IL-6 levels have also been documented in patients with diabetic nephropathy (44). In agreement with these data, our results demonstrate a slight but significant increase of serum TNF $\alpha$  levels and a larger increase in IL-6 levels in NIDDM patients as compared to control subjects. Whether factor(s) associated with the chronic diabetic state, such as advanced glycated end products (45,46) or oxidized LDL (47) may prime monocytes *in vivo* to produce TNF $\alpha$  and IL-6 is currently unknown.

Since monocytes/macrophages are the main sources of body TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, the *in vitro* production of these cytokines by freshly isolated monocytes was also examined. In accordance with the results of Ohno et al. (14), our data did not show any differences in the basal monocyte production of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 between the control and the diabetic groups. In contrast, a significant increase of LPS-stimulated TNF $\alpha$  production by diabetic monocytes was observed. Several studies have suggested a major role of TNF $\alpha$  in the

pathogenesis of atherosclerosis. Indeed, this angiogenic factor has been shown to promote the adhesion of leukocytes to ECs (48,49), to induce chemotaxis (50) and to increase the expression of several cell adhesion molecules (51). In addition, a critical role of TNF $\alpha$  in the induction of insulin resistance has recently been documented (16). The selective enhancement of monocyte TNF $\alpha$  production in NIDDM patients may theoretically contribute to the pathogenesis of atherosclerosis associated with NIDDM. Our observation that gliclazide effectively reduces the monocyte TNF $\alpha$  overproduction suggests that this drug may exert a potential beneficial effect in the prevention of cardiovascular diseases associated to NIDDM.

Recent findings have supported a putative role for localized imbalances of growth factors expression in the development of diabetic vasculopathy (52). Our results demonstrate that serum levels of various growth factors, including IGF-1, VEGF, FGFb, TGF $\beta$  and IL-1 $\beta$  in NIDDM patients do not differ from those observed in control subjects. These data indicate that chronic hyperglycemia in vivo is not associated with increased serum levels of these factors and therefore that the measurement of circulating growth factors in diabetes mellitus is not clinically relevant.

In conclusion, our results demonstrate that short term gliclazide administration to NIDDM patients normalizes the levels of plasma lipid peroxides in these subjects, and the excessive in vitro monocyte adhesion to ECs. They also show that gliclazide treatment effectively reduces the enhanced proatherogenic TNF $\alpha$  in vitro production by diabetic monocytes. The clinical relevance of these findings remains to be determined in prospective long-term studies comparing cardiovascular events and mortality in NIDDM patients treated with different compounds of sulfonylurea.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Les Laboratoires Servier for financial support.

## REFERENCES

1. Chisolm GM, Irwin KC, Penn MS: Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes* 41:61-66, 1992
2. Semenkovich CF, Heinecke JW: The mystery of diabetes and atherosclerosis. Time for a new plot. *Diabetes* 46:327-334, 1997
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-923, 1989
4. Steinbrecher UP, Zhang H, Lougheed M: Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free radical biol & Med* 9:155-168, 1990
5. Heinecke JW: Cellular mechanisms for the oxidative modification of lipoproteins: implication for atherogenesis. *Coronary Artery Dis* 5:205-210, 1994
6. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Ai Kim J, Bamshad B, Esterson M, Fogelman: Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 85:1260-1266, 1990

7. Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, Haberland ME, Fogelman AM, Berliner JA: Partial characterization of leucocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 14:427-433, 1994
8. Fox PL, Chisolm GM, DiCorleto PE: Lipoprotein-mediated inhibition of endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein depends on free radical lipid peroxidation. *J Biol Chem* 262:6046-6054, 1987
9. Hamilton TA, Guoping MA, Chisolm GM: Oxidized low-density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 144:2343-2350, 1990
10. Nathan DM: Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:1676-1685, 1993
11. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K: Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 104-107, 1979
12. Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR, Willey K: Increased oxidizability of plasma lipoproteins in diabetic patients can be decreased by probucol therapy and is not due to glycation. *Biochem pharmacol* 43:995-1000, 1992
13. Fasching P, Veitl M, Rohac M, Strelci C, Schneider B, Waldhausl W, Wagner OF: Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4313-4317, 1996

14. Ohno Y, Aoki N, Nishimura A: In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1072-1077, 1993
15. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SSS, Hawa M, Viberti GC, Watkins PJ, Leslie RDG, Vergani D: Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 39:60-69, 1996
16. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM: Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 94:1543-1549, 1994
17. Chiasson JL, Hamet P, Verdy M: The effect of Diamicon on the secretion and action of insulin. *Diabetes Res Clin Pract* 14:S47-S52, 1991
18. Jennings PE, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JJF: Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetic patients: clinical assessment. *Metabolism* 41:36-39, 1992
19. Desfaits AC, Serri O, Renier G: Gliclazide decreases cell-mediated low density lipoprotein (LDL) oxidation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidatively modified LDL. *Metabolism* in press, 1997
20. Caruso C, Candore G, Cigna D, DiLorenzo G, Sireci G, Dieli F, Salerno A: Cytokine production in the elderly. *Immunol Res* 15:84-90, 1996
21. Kelly MK, Brown JM, Thong YK: Neutrophil and monocyte adherence in diabetes mellitus, alcoholic fibrosis, uremia and elderly patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 78:132-138, 1985

22. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest*:77-89, 1968
23. Hatch FT: Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* 6:1-68, 1968
24. Mihara M, Uchiyama M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271-278, 1978
25. Csallany AS, Der Guan M, Manwaring JD, Addis PB: Free malondialdehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 142:277-283, 1984
26. Bath PMW, Booth RFG, Hassall DG: Monocyte-lymphocyte discrimination in a new microtitre-based adhesion assay. *J Immunol Methods* 118:59-65, 1989
27. Luo M and O'Brien RC: Antioxidant effects of sulphonylureas (Abstract). *Diabetes* 45:123A, 1996
28. Dosquet C, Weill D, Wautier JL: Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Hematol* 34:S55-59, 1992
29. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Ai Kim J, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 85:1260-1266, 1990
30. Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K: Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb* 12:824-829, 1992

31. Scott NA, Jennings PE, Brown J, Belch JF: Gliclazide: a general free radical scavenger. *Eur J Pharmacol* 208:175-177, 1991.
32. Setiadi H, Wautier JL, Courillon-Mallet A, Passa P, Caen J: Increased adhesion to fibronectin and Mo-1 expression by diabetic monocytes. *J Immunol* 138:3230-3234, 1987
33. Weber C, Erl W, Weber PC: Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoproteins is mediated by activation of CD11b. *Biochem Biophys Res Commun* 206:621-628, 1995
34. Gearing JH, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14:506-512, 1993
35. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 95:1262-1270, 1995
36. Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P: High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 45:471-477, 1996
37. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti MG, Moghetti P, Lo Cascio V: Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* 38:1122-1124, 1995
38. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Campagnola M, Davoli A, Rigoni A, Zenti MG, Pastorin AM, Lo Cascio V: E-selectin plasma concentration is influenced



- by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress. *Diabetologia* 40:584-589, 1997
39. Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A, Lo Cascio V: Increased levels of plasma ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 in NIDDM: a possible role of oxidized LDL. *Diabetologia* 39(10):1244, 1996
40. Fasching P, Waldhausl W, Wagner OF: Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM - potential mediators in diabetic macroangiopathy. *Diabetologia* 39(10):1242-1244, 1996
41. Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernst B, Blann AD: Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thromb Haemost* 72:979-984, 1994
42. Tanaka S, Seino H, Satoh J, Fujii N, Rikiishi H, Zhu XP, Takahashi K, Sagara M, Nobunaga T, Toyota T: Increased in vivo production of tumor necrosis factor after development of diabetes in nontreated, long-term diabetic BB rats. *Clin Immunol Immunopathol* 62:258-263, 1992
43. Nguyen P, Durlach V, Leutenegger M, Guenounou M, Potron G: Explosion respiratoire des polynucléaires neutrophiles et profil des cytokines chez le diabétique non insulino-dépendant. *Journal des Maladies Vasculaires* 20:102-105, 1995
44. Sekizuka K, Tomino Y, Sei C, Kurusu A, Tashiro K, Yamaguchi Y, Kodera S, Hishiki T, Shirato I, Koide H: Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 68: 284-285, 1994

45. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A: Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 240:1546-1548, 1988
46. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F: The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann NY Acad Sci* 748:562-570, 1995
47. Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J: Human monocytes/macrophages release tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to oxidized-LDL. *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 16:1573-1579, 1996
48. Cavender D, Saegusa Y, Ziff M: Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol* 139:1855-1860, 1987
49. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8667-8671, 1985
50. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A: Tumor necrosis factor- $\alpha$  is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 138:1469-1474, 1987
51. Bevilacqua MP, Gimbrone MA: Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 13:425-433, 1987
52. Raines EW, Ross R: Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *BioEssays* 18:271-282, 1996

**TABLE 1. SERUM CONCENTRATIONS OF LIPID PEROXIDES IN CONTROL SUBJECTS AND NIDDM PATIENTS BEFORE AND AFTER 3 MONTHS OF GLICLAZIDE TREATMENT.**

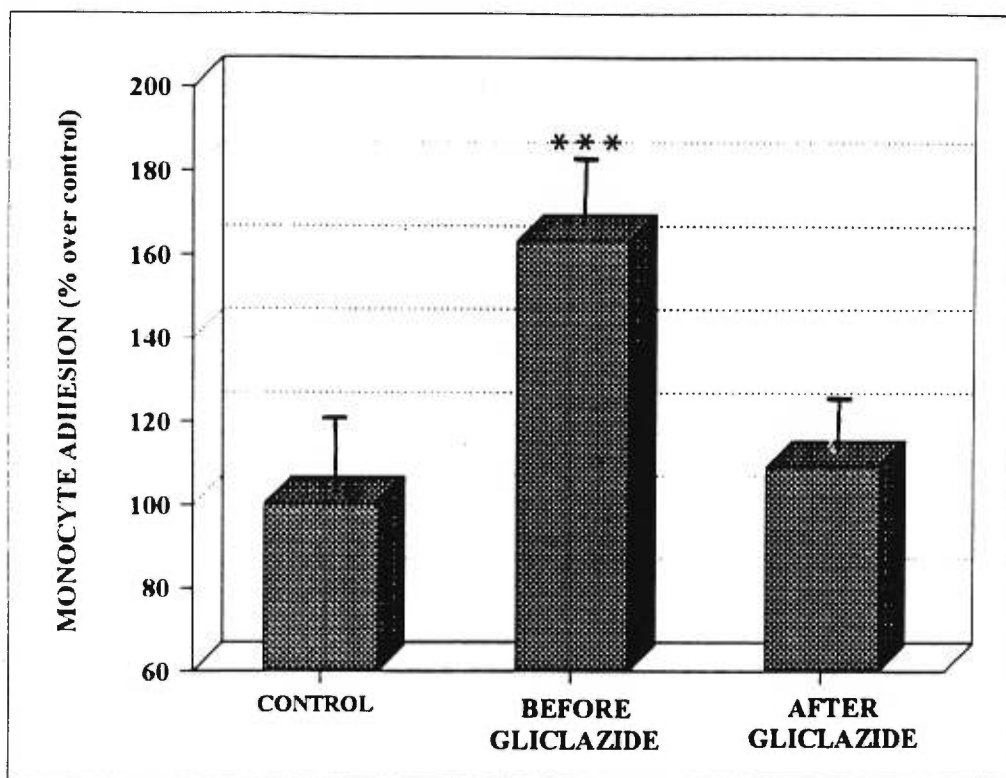
SUBJECTS n	NIDDM 8		CONTROLS 8
	Before gliclazide	After gliclazide	
HbA1c (%)	12.0 ± 1.0	12.3 ± 1.0	-
Lipid peroxides (nmoles MDA/500µl)	9.6 ± 1.1	5.7 ± 1.0***	5.8 ± 0.6

Data represent the mean ± SEM. \*\*\*, P < 0.005 vs values before gliclazide treatment.

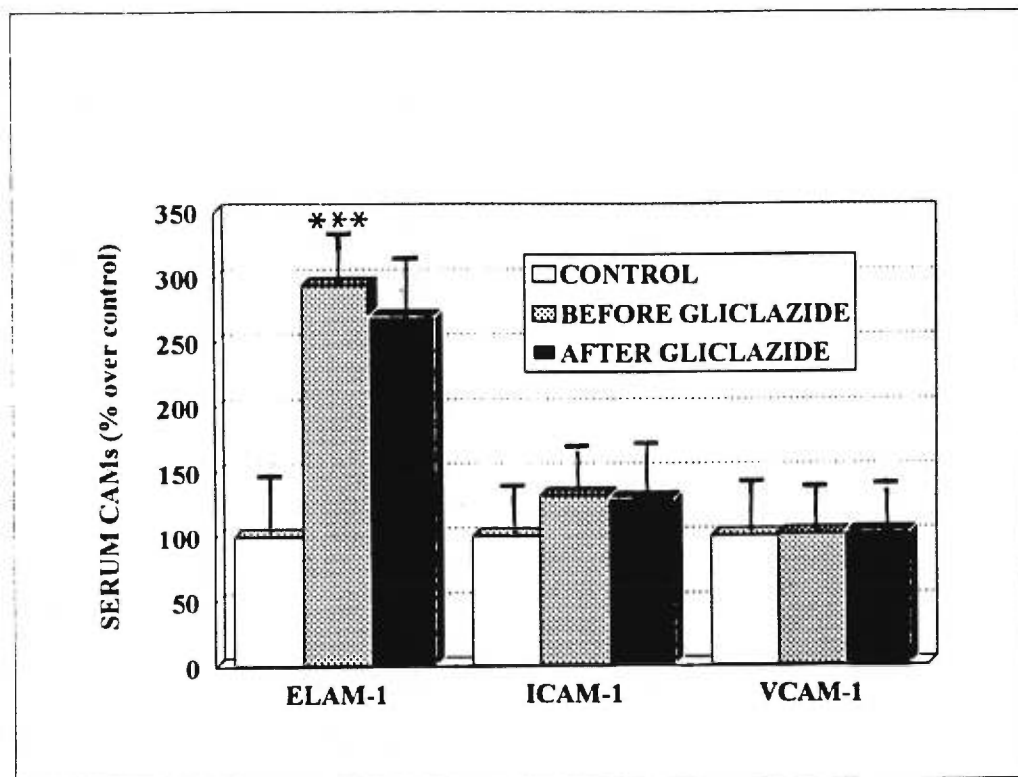
**TABLE 2. SERUM LEVELS OF CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN NIDDM PATIENTS AND CONTROL SUBJECTS.**

<b>CYTOKINES</b>	<b>NIDDM</b>	<b>CONTROLS</b>
FGFb (pg/ml)	1.99 ± 0.60	2.69 ± 0.43
IGF-1 (ng/ml)	134 ± 32	130 ± 26
IL-1β (pg/ml)	0.22 ± 0.04	0.25 ± 0.08
IL-6 (pg/ml)	3.37 ± 0.64 ***	0.99 ± 0.16
TGFb (ng/ml)	0.55 ± 0.05	0.59 ± 0.04
TNFα (pg/ml)	1.28 ± 0.08 **	1.08 ± 0.10
VEGF (pg/ml)	33.4 ± 10.3	35.20 ± 4.90

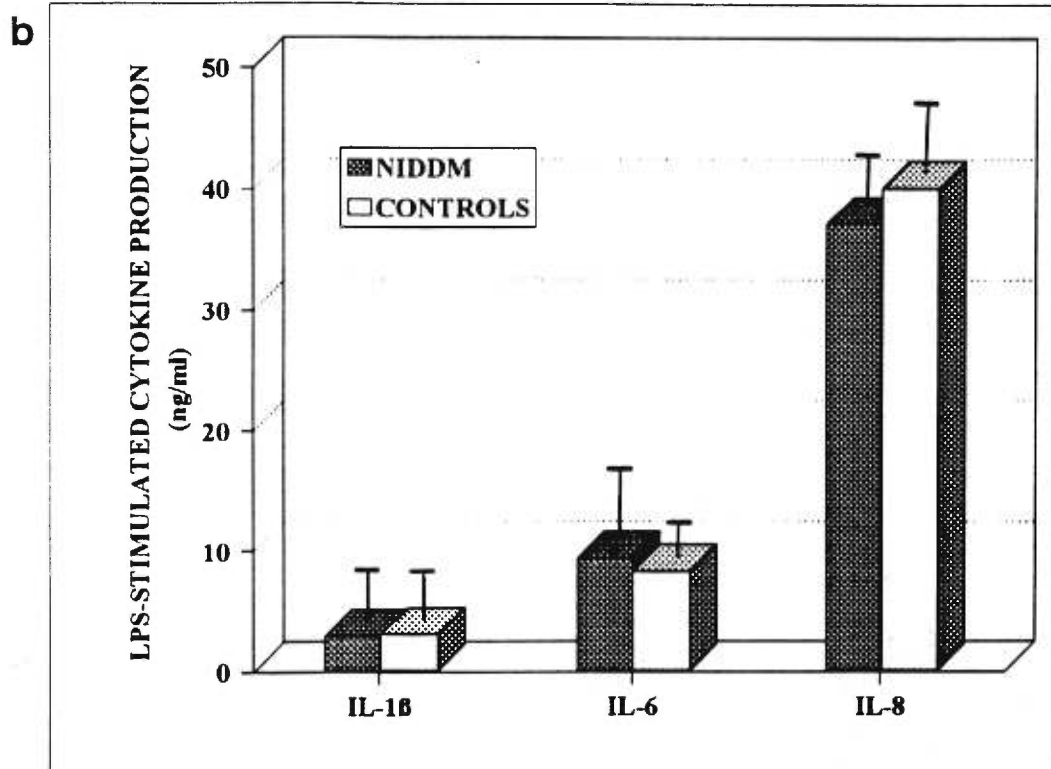
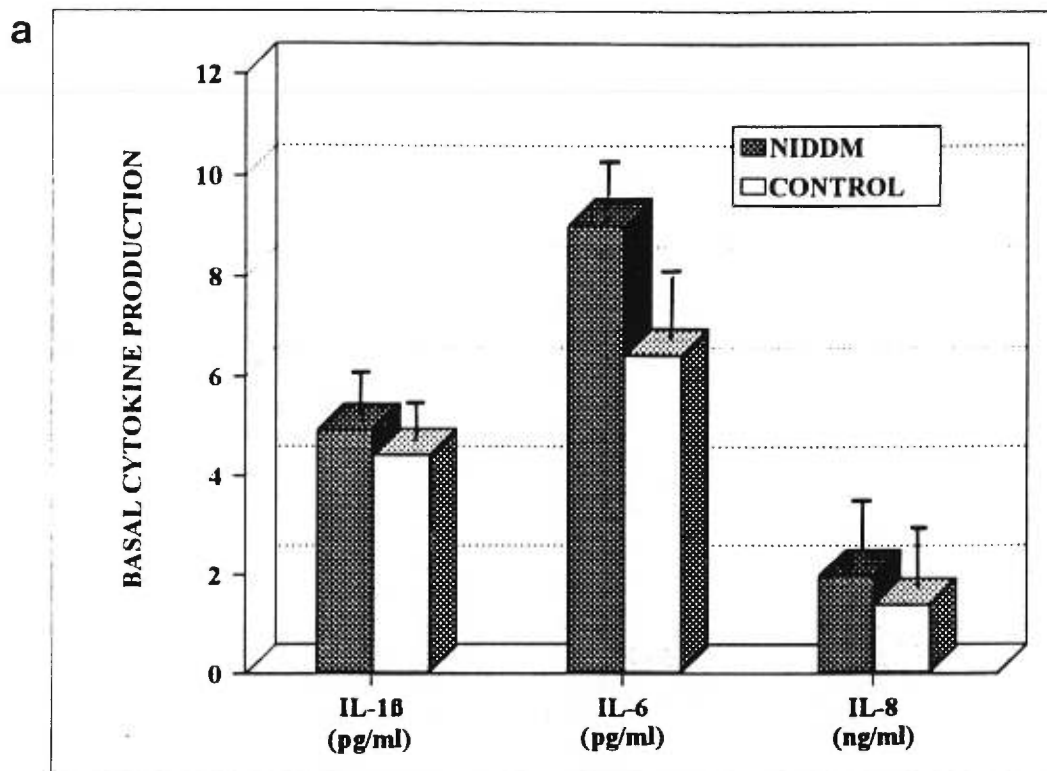
Data represent the mean ± SEM. \*\*, P< 0.01, \*\*\*,P< 0.005 vs control values.



**Fig 1.** Monocyte adhesion in NIDDM patients before and after gliclazide treatment. Results were expressed as % adhesion over control values. Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $P < 0.005$  vs controls.

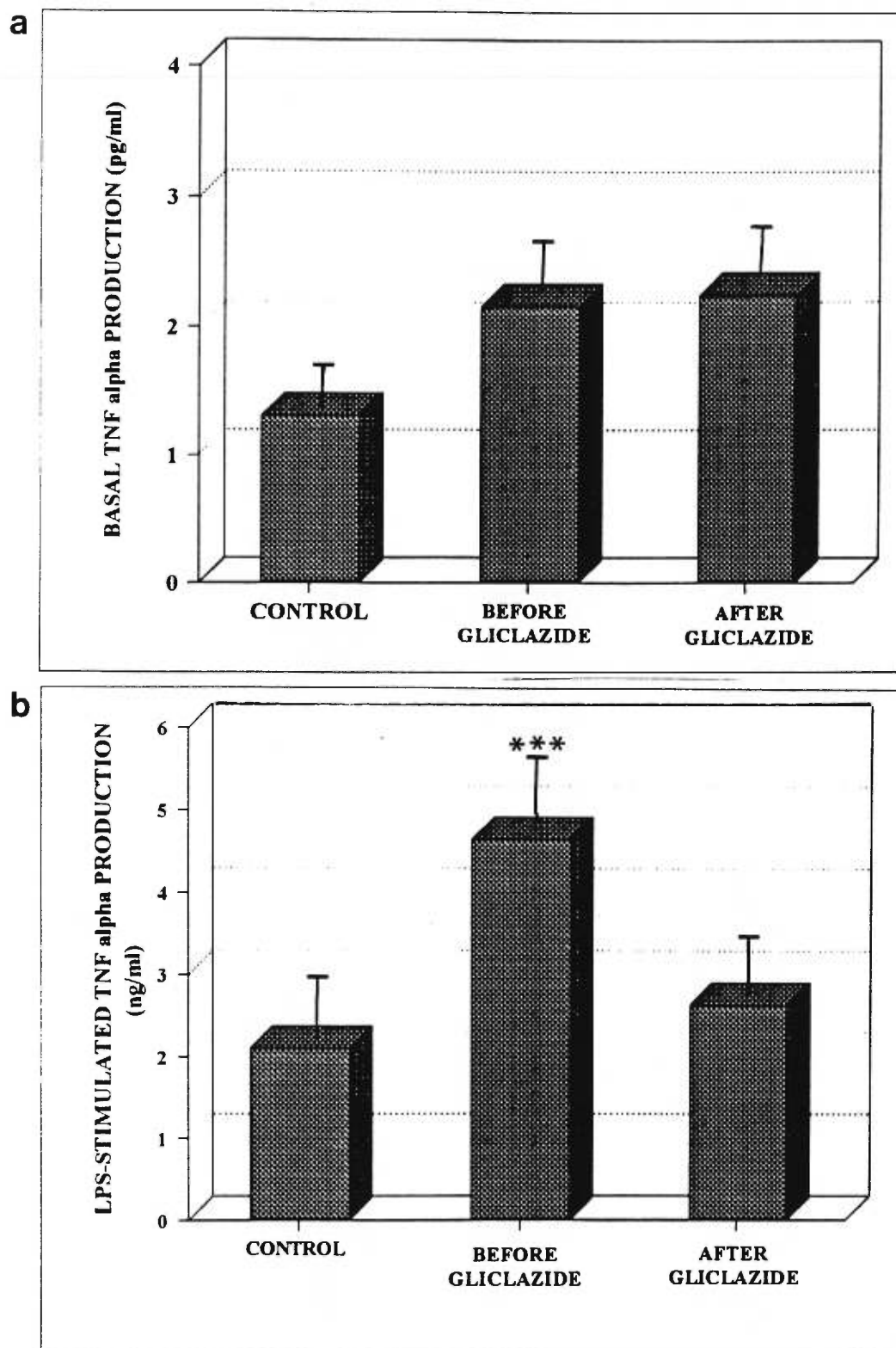


**Fig 2.** Serum levels of cell adhesion molecules (CAMs) in control subjects and in NIDDM patients, before and after gliclazide treatment. Results were expressed as % over control values. Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $P < 0.005$  vs controls.



**Fig 3. Panel a:** Basal monocyte cytokines production in NIDDM patients and controls. Data represent the mean  $\pm$  SEM.

**Panel b:** LPS-stimulated monocyte cytokines production in NIDDM patients and controls. Data represent the mean  $\pm$  SEM.



**Fig 4.** Panel a: Basal monocyte TNF $\alpha$  production in controls and NIDDM patients, before and after gliclazide treatment. Data represent the mean  $\pm$  SEM.

Panel b: LPS-stimulated monocyte TNF $\alpha$  production in controls and NIDDM patients, before and after gliclazide treatment. Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $P < 0.005$  vs controls.



---

Submitted to Diabetologia

**Gliclazide reduces the induction of human monocyte adhesion to endothelial cells by advanced glycation end products.**

Anne-Cécile DESFAITS, Omar SERRI and Geneviève RENIER.

Metabolic Unit, CHUM Research Center, Notre-Dame Pavilion and Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Canada.

Running title: Effect of gliclazide on AGE-induced human monocyte adhesion.

Key words: Advanced glycation end products, monocyte adhesion, adhesion molecules, gliclazide.

Reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier  
CHUM Research Center  
Notre-Dame Pavilion  
3<sup>rd</sup> floor, J.A. de Sève, Y-3622  
1560 Sherbrooke Street East  
Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1  
Phone: (514)-281-6000 #6895  
FAX: (514)-896-4762  
Email: Renierg@ere.umontreal.ca

## SUMMARY

Chronic hyperglycemia is known to exert long lasting changes in cellular function, which result in part from advanced glycation end products (AGEs). AGEs have been shown to increase the adhesion of the lymphoblastic Molt-4 cells to endothelium and to induce, by an oxidant-sensitive mechanism, the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured endothelial cells (ECs). In the present study, we examined the kinetic of AGE-stimulated human monocyte adhesion to endothelium and the contributive role of E-selectin (ELAM-1), VCAM-1 and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) on this effect. In addition, based on the antioxidant properties of gliclazide, an hypoglycemic agent, we evaluated the effect of this drug on these parameters. Exposure of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for 1 to 48 hours to glycated albumin (AGE-BSA) (100 $\mu$ g/ml) led to a time-dependent increase in human monocyte adhesion to these cells. Maximal effect of AGE-BSA on monocyte adhesion was observed from 4 to 12 hours. Pretreatment of ECs with monoclonal antibodies against ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 reduced the stimulatory effect of AGE-BSA on monocyte adhesion. In AGE-BSA-treated HUVECs, an induction of both soluble and cell-associated expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 was observed. This induction was associated with increased levels of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 transcripts. AGE-treated ECs also showed increased specific DNA binding activity for NF- $\kappa$ B in the promoter of these cell adhesion molecules. Pretreatment of ECs with gliclazide (10  $\mu$ g/ml) significantly decreased AGE-BSA-stimulated monocyte adhesion to ECs and AGE-BSA-induced EC expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1, both at the protein and gene levels. Gliclazide also markedly

decreased the AGE-BSA-induced DNA binding activity for NF- $\kappa$ B in the ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 promoters. Overall, these results show that AGEs induce the expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in ECs, which can prime endothelium for increased interaction with human monocytes. The inhibitory property of gliclazide on these effects suggests that this drug could be of benefit to prevent the development of diabetic vasculopathy.

**Key words:** Advanced glycation end products, monocyte, adhesion, endothelial cells, gliclazide.

## INTRODUCTION

Chronic hyperglycemia is considered to be a major factor in the development of diabetic vascular diseases (1). One biochemical mechanism by which hyperglycemia may contribute to these complications is the formation and accumulation in the plasma and vessel wall of diabetic patients of irreversible products called advanced glycation end products (AGEs) (2,3). AGE modified proteins have been shown to exert, through their binding to specific cell receptors, several proatherogenic properties, including increased endothelial cell permeability and procoagulant activity, enhanced mononuclear cell chemotaxis and macrophage uptake of AGE-low density lipoprotein (LDL) and increased oxidative stress levels and LDL oxidation (4). The identification of AGEs in human atherosclerotic lesions (5,6), further suggests their involvement in diabetic atherosclerosis.

Monocyte-endothelial cell (EC) interactions play a crucial role in the initiation of the atherosclerotic process (7). Monocyte adhesion to ECs is mediated through specific vascular cell adhesion molecules, including E-selectin (ELAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (8,9). In diabetes, enhanced monocyte adhesion to cultured ECs and increased serum levels of soluble adhesion molecules have been reported (10-12). Recent data have demonstrated that AGEs enhance the adhesivity of ECs for Molt-4 cells by inducing, through an oxidant-sensitive mechanism, the expression of VCAM-1 (13). These modified proteins have also been shown to promote VCAM-1 and ICAM-1 expression in rabbit atheroma (14).

To examine the effect of AGEs on human monocyte adhesion to endothelium and to study the molecular mechanisms underlying AGE-induced monocyte adhesion, we

measured in the present study the kinetic of human monocyte adhesion to ECs treated with glycated albumin (AGE-BSA). We also investigated the contributive role of ELAM-1, VCAM-1, and ICAM-1 in this process. In addition, based on the antioxidant properties of gliclazide (15), we examined the effect of this drug on AGE-induced monocyte adhesion to ECs. Our results demonstrate that AGEs increase human monocyte adhesion to endothelium by enhancing via an NF- $\kappa$ B-dependent mechanism, the endothelial cell expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1. Our observation that gliclazide effectively inhibits AGE-induced monocyte adhesion suggests a beneficial effect of this drug in the prevention of diabetic vascular complications.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Reagents

RPMI-1640 was purchased from Gibco (Grand Island, NY), penicillin-streptomycin and foetal calf serum (FCS) were obtained from Flow Laboratories (McLean, VA) and Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT), respectively. L-glutamine was obtained from ICN Biochemicals Inc. (Costa Mesa, CA). Dianisidine dihydrochloride and hexadecyltrimethylamine ammonium bromide (HTAB) were purchased from Sigma chemical Co. (St-Louis, MO). Gliclazide was kindly provided by les Laboratoires Servier (Neuilly, France).

### Preparation of glycated albumin (AGE-BSA)

AGE-modified albumin was obtained by incubating immunoglobulin free BSA (Sigma chemical Co., St-Louis, MO) with glucose (0.5M) at 37°C for 4 weeks. Non glycated albumin (CTL-BSA) was treated identically, except that no glucose was added in the reaction mixture. Endotoxin content of the CTL- and AGE-BSA preparations (100µg/ml) was determined by the limulus amebocyte lysate assay (E-toxate, Sigma chemical Co., St-Louis, MO) and was consistently found to be lower than 6 pg/ml.

### Endothelial cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Clonetics (San Diego, CA) and grown to confluence in endothelial growth culture medium (Clonetics, San Diego, CA). ECs were used in the experiments between passages 3 to 5.

### Human monocyte isolation

Fresh heparinized blood (100ml) was obtained from healthy non smokers male and female donors. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll (Gibco-BRL, Grand Island, NY) (16), allowed to aggregate in presence of FCS, then further purified by rosetting technique. After density centrifugation, recovery of highly purified monocytes (85-90%) as assessed by FACS analysis was obtained. Monocytes were resuspended in serum-free RPMI-1640 medium with 2mM glutamine supplemented with 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin and used immediately for adhesion assay.

### Adhesion assay

The day of the experiment, the medium of confluent monolayers of ECs was removed and replaced by fresh serum-free RPMI-1640 medium. One hundred µl of a monocytic cell suspension ( $2.3 \cdot 10^6$  cells/ml) was then added to each well. After a 30 minute incubation period, non-adherent monocytes were removed by washing twice with phosphate buffer saline without calcium or magnesium (PBS-A). Adherent cells were lysed in 50µl of HTAB (0.5%) in PBS-A at pH 6.0 for 30 min. Quantification of adherent monocytes was made by measuring monocyte myeloperoxidase (MPO) activity (17). Briefly, MPO activity was determined by the addition to each well of 250 µl of dianisidine dihydrochloride (0.2mg/ml in PBS-A) warmed up at 37°C and mixed with hydrogen peroxide (0.4mM final concentration). After 2-5 min of incubation, the optical density of the plate wells was read at 450nm using a Titertek multiscan (Flow Laboratories) spectrophotometer.

#### Determination of soluble cell adhesion molecule levels

Determination of soluble VCAM-1, ICAM-1 and ELAM-1 levels in the culture supernatants of ECs was performed by ELISA using commercial kits from R&D systems (Minneapolis, MN). Before determinations, culture supernatants were subjected to a 10-fold concentration using centrprep concentrators (Amicon, Oakville, Ontario). The limits of detection in these assays were less than 2, 0.1 and 0.35 ng/ml for VCAM-1, ELAM-1 and ICAM-1, respectively.

#### Determination of cell-associated adhesion molecule expression

Endothelial cell surface expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 was determined by a cellular-ELISA method, as previously described by Hashemi et al. (18). After treatment with the appropriate agents, confluent ECs were washed with PBS and used without fixation. To block non-specific binding, ECs were treated for 1 hour at room temperature with PBS-3% BSA. After washing, 10 $\mu$ g/ml of monoclonal antibodies (mAbs) against VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1 and control IgG (R&D systems, Minneapolis, MN) were added for 2 hours at 37°C to the cells. After washing, ECs were treated for 90 minutes at room temperature with a horseradish conjugated anti-mouse IgG (1/1000) (Bio-Rad, Mississauga, Ontario). The peroxidase substrate, *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma chemical Co., St Louis, MO), was then added for 15 minutes at room temperature to the cells. The reaction was stopped by addition of 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5M) and the optical density was determined at 490 nm with an ELISA reader (Titertek multiscan spectrophotometer, Flow Laboratories).



### Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The levels of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expression in HUVECs were measured by RT-PCR. Total cytoplasmic RNA was extracted from  $10^6$  cells with the TRIzol reagent (Gibco-BRL, Grand Island, NY), using a modification of the Chomczynski and Sacchi method (19). Complementary DNA (cDNA) was obtained by Escherichia coli Expand reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) and amplified using *Taq* Expand polymerase (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) and specific synthetic primers (ACGT corp., Toronto, Ontario, Canada) with the following sequences: GADPH, 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3' and 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'; ELAM-1, 5'-AGAAAGTGGAGCCTGGTC-3' and 5'-CTCTATGCATTACCCATGG-3'; ICAM-1, 5'-AGAACCTTACCCTACGCTGC-3' and 5'-GCCTGGCACATTGGAGTCTG-3'; VCAM-1, 5'-AGGAATCCAGTGGAGAT-3' and 5'-GAATCTTCCATCCTCATAGC-3'. The PCR was performed in a Perkin-Elmer thermal cycler and the number of cycles was optimized for a semi-quantitative PCR (30 cycles for GADPH and 42 cycles for ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1). PCR products were analysed on a 1% agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide.

### Adhesion blockade assay

ECs were preincubated for 1 hour with 10 µg/ml mAbs against ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1 or control anti-IgG (1mg/ml) (R&D systems, Minneapolis, MN) prior to be exposed for 4 to 12 hours to CTL- or AGE-BSA. At the end of the incubation period, monocyte adhesion to ECs was measured by the MPO assay.

### Preparation of nuclear extracts

Nuclear extracts were prepared as previously described (20). Briefly,  $10^6$  ECs were trypsinized, collected, washed with cold PBS, and lysed in 1 ml of ice-cold buffer A (15mM KCl, 2mM  $MgCl_2$ , 10mM HEPES, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 2 $\mu$ g/ml aprotinin, 0.1% PMSF, and 0.5% Nonidet P-40). After a 10-min incubation on ice, lysed cells were centrifuged and the nuclei were washed with buffer A without Nonidet P-40. The nuclei were then lysed in a buffer containing 2M KCl, 25mM HEPES, 0.1mM EDTA, and 1mM DTT. After a 15-min incubation period, a dialysis buffer (25 mM HEPES, 1mM DTT, 0.1% PMSF, 2 $\mu$ g/ml aprotinin, 0.1mM EDTA, and 11% glycerol) was added to the nuclei preparation. Nuclei were collected by centrifugation for 20 minutes at 13000g. Aliquots of the supernatants (50 $\mu$ l) were collected, frozen at  $-70^\circ C$  and the protein concentration was determined.

### Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA was performed according to the method of Fried and Crothers (20). Nuclear extracts (5 $\mu$ g) were incubated for 15 min in the presence of 5X binding buffer (125 mM HEPES, pH 7.5, 50% glycerol, 250mM NaCl, 0.25% Nonidet P-40, 5 mM DTT). Double-stranded oligonucleotides representing a portion of the human ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 promoters containing an NF- $\kappa$ B site (ELAM-1: 5'-CCATTGGGGATTTCCTCTTT-3'; ICAM-1: 5'-TTAGCTTGGAAATTCGGAG-3'; VCAM-1: 5'-CCTTGAAGGGATTTCC-CTCC-3') were synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer (ACGT Corp, Toronto, Ontario, Canada) according to previously published sequences (21). Oligonucleotides were end-labelled with  $\gamma$ -[ $^{32}P$ ] ATP

using the Boehringer Mannheim 5'-end-labeling kit and added (12,000 cpm per sample) to the samples for 30 min. Samples were analyzed on a non-denaturing 4% polyacrylamide gel, containing 0.01% Nonidet P-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from ECs with labeled DNA probe in the presence of a 100-molar excess of non-labeled DNA probe.

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed by one-way ANOVA analysis followed by the Tukey's Test. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### Effect of AGE-BSA on human monocyte adhesion to cultured human ECs.

Incubation of cultured HUVECs in presence of AGE-BSA (100µg/ml) for 1 to 48 hours resulted in a time-dependent increase in human monocyte adhesion to these cells. Maximal effect of AGE-BSA on monocyte adhesion was observed from 4 to 12 hours. This effect gradually declined towards baseline after 24hours of stimulation by AGE-BSA (Fig. 1a). CTL-BSA, used as control, did not significantly affect monocyte adhesion to HUVECs (Fig. 1a).

### Effect of mAbs against EC adhesion molecules on AGE-BSA-induced human monocyte adhesion to cultured human ECs.

Preincubation of HUVECs for 1hour in presence of mAbs (10µg/ml) against ELAM-1, ICAM-1 or VCAM-1 prior to the addition of AGE-BSA reduced the stimulatory effect of AGE-BSA on monocyte adhesion. Anti-ELAM-1 mAb markedly inhibited the increase in monocyte adhesion induced by AGE-BSA at 4 and 6 hours ( $P < 0.005$ ), whereas anti-VCAM-1 and anti-ICAM-1 did not (Fig. 1b). Anti-ICAM-1 and anti-VCAM-1 mAbs dramatically decreased monocyte adhesion induced by AGE-BSA at 12 hours, whereas anti-ELAM-1 was ineffective to inhibit this process (Fig. 1b).

### Effect of AGE-BSA on EC adhesion molecule expression

To evaluate the effects of AGE-BSA on EC expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1, the levels of soluble and cell associated adhesion molecules were measured in HUVECs treated with AGE-BSA. Studies of the time course of AGE-BSA-mediated

induction of ELAM-1 demonstrated a parallel increase in both soluble and cell associated expression of this antigen after 4 hours of stimulation by AGE-BSA (Fig. 2a and Fig. 3a). Similar increase in the expression of ELAM-1 was observed after a 6 hour treatment with AGE-BSA (data not shown). Induction of ELAM-1 fell to basal values by 12 hours (Fig. 2b and Fig. 3b). Unlike ELAM-1, soluble and cell associated VCAM-1 and ICAM-1 antigens were not significantly enhanced until 12 hours after treatment of HUVECs with AGE-BSA (Fig. 2b Fig. 3b).

#### Effect of AGE-BSA on EC adhesion molecules mRNA levels

To determine whether AGE-BSA increases the expression of EC adhesion molecules at the mRNA level, ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA levels were measured in AGE-BSA-treated HUVECs. Treatment of HUVECs with AGE-BSA for 4 hours resulted in a significant increase in ELAM-1 mRNA levels (Fig. 4). Induction of ICAM-1 and VCAM-1 mRNA levels was observed after a 12 hours exposure of HUVECs to AGE-BSA (Fig. 4).

#### Effect of AGE-BSA on the DNA binding activity for NF- $\kappa$ B in the ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 promoters.

To determine whether NF- $\kappa$ B activation is responsible for the induction of EC adhesion molecules in AGE-BSA-treated HUVECs, the effect of AGE-BSA on the binding of nuclear proteins to the NF- $\kappa$ B consensus sequence of the ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 promoters was examined. Incubation of HUVECs with AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) for 4 hours resulted in a significant increase of nuclear protein binding to the NF- $\kappa$ B consensus

sequence of the ELAM-1 promoter region (Fig. 5). Increased DNA binding activity for NF- $\kappa$ B in the ICAM-1 and VCAM-1 promoters was observed after a 12 hour exposure of HUVECs to AGE-BSA (Fig. 5).

Effect of gliclazide on AGE-BSA-stimulated monocyte adhesion and EC adhesion molecule expression.

Pretreatment of HUVECs with gliclazide (10 $\mu$ g/ml) for 1h prior to the addition of AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) significantly reduced the stimulatory effect of AGE-BSA on human monocyte adhesion to ECs (Fig. 6). Maximal inhibitory effect of this drug on AGE-BSA-induced monocyte adhesiveness to HUVECs was observed at 4, 6, 12 and 24 hours and reached 40 to 50% (Fig. 6). Gliclazide also markedly reduced the AGE-BSA-mediated induction of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 antigens. The inhibitory effect of this drug was observed on both soluble and cell associated expression of these adhesion molecules (Fig. 7a, 7b and Fig. 8a, 8b).

Inhibitory effect of gliclazide on AGE-BSA-induced EC adhesion molecules mRNA expression and NF- $\kappa$ B activation.

To determine the mechanisms underlying the inhibitory effect of gliclazide on AGE-BSA-induced EC expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1, mRNA levels of these adhesion molecules were measured in AGE-BSA-treated HUVECs in the presence or absence of gliclazide. Gliclazide markedly reduced the induction of ELAM-1 mRNA expression in HUVECs treated for 4 hours with AGE-BSA. This drug also inhibited the

AGE-BSA-mediated induction of ICAM-1 and VCAM-1 mRNA observed after a 12 hour treatment of HUVECs with AGE-BSA (Fig. 4).

To examine whether gliclazide exerts this inhibitory effect by reducing on NF- $\kappa$ B activation, the effect of this drug on the AGE-BSA-induced expression of DNA binding activity for the NF- $\kappa$ B site in the ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 promoters was next tested. Our results demonstrate that induction of DNA binding activity for NF- $\kappa$ B by AGE-BSA in the promoters of all these adhesion molecules was significantly decreased by gliclazide (Fig. 5).

## DISCUSSION

Monocyte binding to endothelium, a key step in early atherogenesis, is enhanced in type II diabetic patients (22). The mechanisms underlying this alteration are not well known. Our study demonstrates that AGEs enhance human monocyte adhesion to HUVECs and that this effect involves the induction of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression in ECs. These findings are in accordance with previous data showing that AGEs increase the adhesivity of ECs for the human lymphoblastic Molt-4 cells (13) and enhance the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in rabbit atheroma (14). In contrast with the results of Schmidt et al. who demonstrated a maximal binding of Molt-4 cells to endothelium after a 2 hour stimulation of ECs with AGEs (13), our data show a sustained time-dependent increase in human monocyte adhesion to AGE-treated HUVECs, peaking between 4 and 12 hours. Since HUVECs were used in both studies, this discrepancy seems to be related to the different mononuclear cells used: a lymphoblastic cell line in the study of Schmidt et al. (13) and peripheral blood monocytes in our study.

Monocyte adhesion to the endothelium is a multi-step process (23) involving the up-regulation of a variety of EC adhesion molecules such as ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 (21). In vitro and in vivo studies indicate that the initial attachment of monocytes to the vessel wall is mediated by selectins, whereas VCAM-1 and ICAM-1 contribute to the firm attachment of monocytes to the endothelium (23). Data generated from the adhesion blockade assay clearly demonstrate that induction of ELAM-1 expression is responsible for the early stimulatory effect (4-6 hours) of AGEs on monocyte adhesion, while increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 are responsible for the delayed effect of AGE-BSA



on this process. These observations suggest that AGEs are important determinants of at least two different steps involved in the binding of monocytes, the rolling and the strong adhesion processes. The kinetic pattern of the induction of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 by AGE-BSA is very close to the one observed after stimulation of ECs by other agents. Peak expression of ELAM-1 occurs after a 4 to 6 hour stimulation of ECs by many cytokines (25) and VCAM-1 and ICAM-1 expression is induced in response to identical stimuli after 6 to 10 hours and 12 to 24 hours, respectively (25). Whether AGEs may synergize with these stimuli is presently unknown and remains to be investigated. In accordance with the study of Schmidt et al. (13), who reported increased VCAM-1 expression in AGE-BSA-treated ECs, we found that exposure of ECs to AGE-BSA induces the expression of VCAM-1, but also the expression of ELAM-1 and ICAM-1 at the endothelial cell surface. AGE-BSA enhanced the release of these adhesion molecules antigens into ECs supernatants too. Considering the correlation existing between the levels of the soluble and cell-associated fractions of endothelial cell adhesion molecules, determination of the soluble levels of these molecules in the plasma of diabetic patients could theoretically represent a good mean to monitor vascular perturbations in these subjects (13,14). This possibility is supported by previous results showing that diabetic patients exhibit high levels of circulating ELAM-1 and VCAM-1 (10-12) and demonstrating that these alterations are related to increased monocyte-endothelium interaction (26).

The cellular interactions of AGEs are mediated by specific receptors, termed RAGE, expressed on various cells including ECs, smooth muscle cells, mesangial cells, neurons and mononuclear phagocytes. By their ability to induce oxidant stress (30, 31), AGE tethering to cell surface RAGE may lead to functional perturbations of cellular functions

(2,27-29). Schmidt et al. previously demonstrated that induction of VCAM-1 expression in cultured AGE-treated ECs occurs by a mechanism involving AGE-RAGE-induced oxidant stress and activation of the transcriptional factor NF- $\kappa$ B (13). Data presented in the present paper provide evidence that AGE-BSA also leads to enhanced EC expression of ELAM-1 and ICAM-1 and exerts this effect by inducing NF- $\kappa$ B activity. Taken together, these data support the hypothesis that NF- $\kappa$ B could be a critical transcriptional factor involved in the regulation of these genes by AGE-BSA. The ability of several antioxidants to block EC activation by inhibiting NF- $\kappa$ B has been previously reported (33-35). Previous in vitro studies have demonstrated that gliclazide, a second generation sulfonylurea widely used in the treatment of diabetic patients, is a general free radical scavenger (32). We have recently reported that this drug effectively inhibits in vitro LDL oxidation and oxidized LDL-induced human monocyte adhesion to ECs (15). Our data provide first evidence that gliclazide, inhibits AGE-BSA-induced monocyte adhesion to ECs. The mechanisms underlying this suppressive effect involve an inhibition of EC associated expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 antigens. The inhibitory effect of gliclazide on the expression of these cell adhesion molecules is exerted at the transcriptional level, as reflected by the depressed levels of these antigens in gliclazide-treated HUVECs. These results are in accordance with previous data showing an inhibitory effect of antioxidants on the mRNA levels of several EC adhesion molecules (35-37). Our observation that gliclazide inhibits the AGE-induced expression of DNA binding activity for the NF- $\kappa$ B site in the ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 promoters suggests that the antioxidant properties of this drug are responsible for the decreased expression of these adhesion molecules. The suppressive effect of gliclazide on NF- $\kappa$ B activation supports the possibility that this drug

may inhibit a wide variety of genes expressed on activated ECs that share a binding site for this transcriptional factor, including genes coding for various adhesion molecules, cytokines and prothrombotic molecules. In addition, since NF- $\kappa$ B regulates gene expression in ECs upon various cytokine-induced activation, it is possible that this drug may also inhibit ECs activation in response to other stimuli than AGEs.

In summary, this study demonstrates that AGEs stimulate human monocyte adhesion to ECs by inducing, via a sensitive-oxidant mechanism, cell-associated ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-I both at the protein and gene levels. Our data also indicate that gliclazide inhibits AGE-stimulated monocyte adhesion by reducing AGE-mediated induction of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-I and NF- $\kappa$ B activation. Since therapeutic plasma concentrations of gliclazide in diabetic patients are in the range of those used in the present in vitro experiments (5-10  $\mu$ g/ml), this drug may be of potential benefit in the prevention of atherosclerosis associated with type II diabetes.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Les Laboratoires Servier for financial support.

**REFERENCES**

1. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group (1993) The effect of intensive insulin treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986
2. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *New Engl J Med* 318:1315-1321
3. Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412
4. Vlassara H (1994) Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med* 124:19-30
5. Brownlee M (1992) Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 15:1835-1843
6. Horiuchi S (1996) Advanced glycation end products (AGE)-modified proteins and their potential relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 6:163-168
7. Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N Engl J Med* 314:488-500
8. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
9. Beekhuizen H, Corsel-van Tilburg AJ, van Furth R (1990) Characterization of monocyte adherence to human macrovascular and microvascular endothelial cells. *J Immunol* 145:510-518

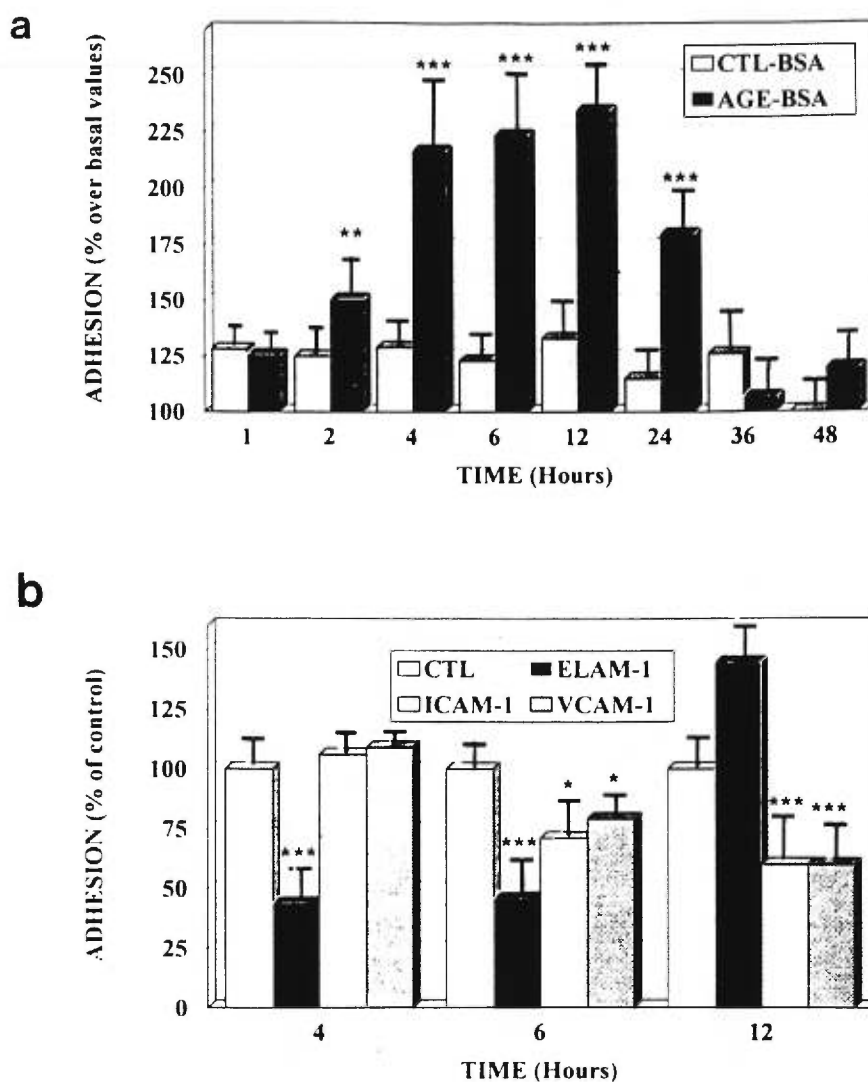
10. Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernst B, Blann AD (1994) Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thrombosis and Haemostasis* 72:979-984
11. Fasching P, Veitl M, Rohac M, Strelci C, Schneider B, Waldhausl W, Wagner OF (1996) Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with macrovascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4313-4317
12. Desfaits AC, Serri O, Renier G (1998) Monocyte adhesion to endothelial cells and tumor necrosis factor alpha production in type II diabetic patients: effect of gliclazide. *Diabetes Care*, in press
13. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li, JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D (1995) Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96:1395-1403
14. Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M (1995) Advanced glycation endproducts promote adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Molec Med* 1:447-456
15. Desfaits AC, Serri O, Renier G (1997) Gliclazide decreases cell-mediated low density lipoprotein (LDL) oxidation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidatively modified LDL. *Metabolism* 46:1150-1156

16. Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 97:77-89
17. Bath PMW, Booth RFG, Hassall DG (1989) Monocyte-lymphocyte discrimination in a new microtitre-based adhesion assay. *J Immunol Methods* 118:59-65
18. Hashemi S, Smith CD, Izaguirre CA: anti-endothelial cell antibodies (1987) Detection and characterization using a cellular ELISA. *J Lab Clin Med* 109:434-440
19. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
20. Fried M, Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res* 9:6505-6525
21. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9:899-909
22. Dosquet C, Weill D, Wautier JL (1992) Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Hematol* 34:S55-S59
23. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multiple step paradigm. *Cell* 76:311-314
24. Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR (1997) Cell adhesion molecules. An update. *Vet Pathol* 34:61-73
25. Scholz D, Devaux B, Hirche A, Potzsch B, Kropp B, Schaper W, Schaper J (1996) Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res* 284:415-423

26. Gearing JH, Newman W (1993) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14:506-512
27. Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, Vlassara H (1991) Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation end products: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* 174:515-524
28. Schmidt AM, Hori O, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D (1994) The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consist of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 269:9882-9888
29. Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto, Stern D (1996) A novel receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45:S77-S80
30. Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, Brett JG, Lamster IB (1996) Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodont Res* 31:508-51
31. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M (1990) Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Com* 173:92-99
32. Scott NA, Jennings PE, Brown J, Belch JFF (1991) Gliclazide: a general free radical scavenger. *Eur J Pharmacol* 208:175-177

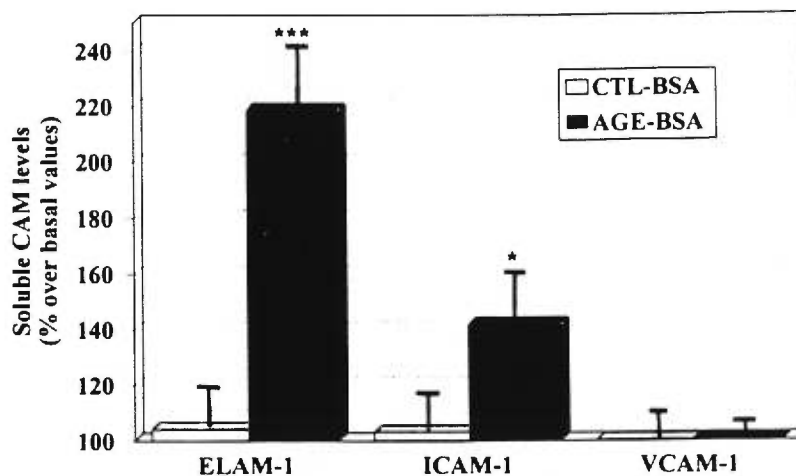
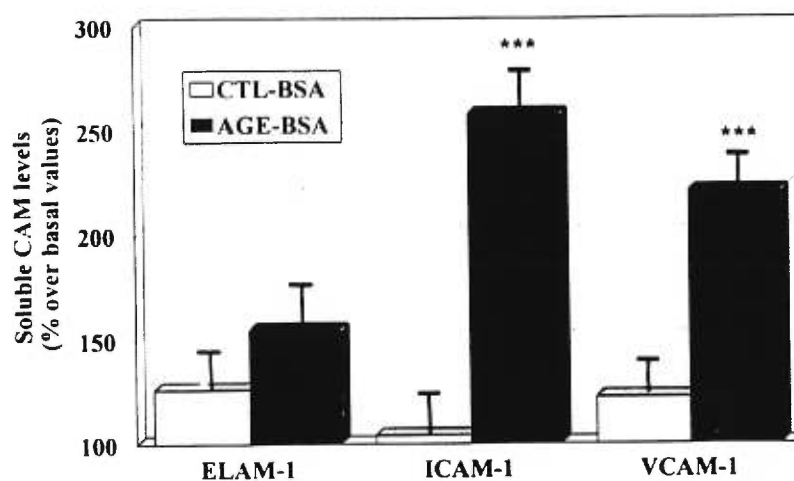


33. Weber C, Erl W, Pietsh A, Weber PC (1995) Aspirin inhibits nuclear factor-kappaB mobilisation and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 91:1914-1917
34. Weber C, Erl W, Pietsh A, Strobel M, Ziegler-Heibroek HWL, Weber PC (1994) Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilisation and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* 14:1665-1673
35. Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler H (1995) Inhibition of NF- $\kappa$ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Com* 214:212-223
36. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92:1866-1874
37. Kawai M, Nishikomori R, Jung EY, Tai G, Yamanaka C, Mayumi M, Heike T (1995) Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits intercellular adhesion molecule-1 biosynthesis induced by cytokines in human fibroblasts. *J Immunol* 154:2333-2341

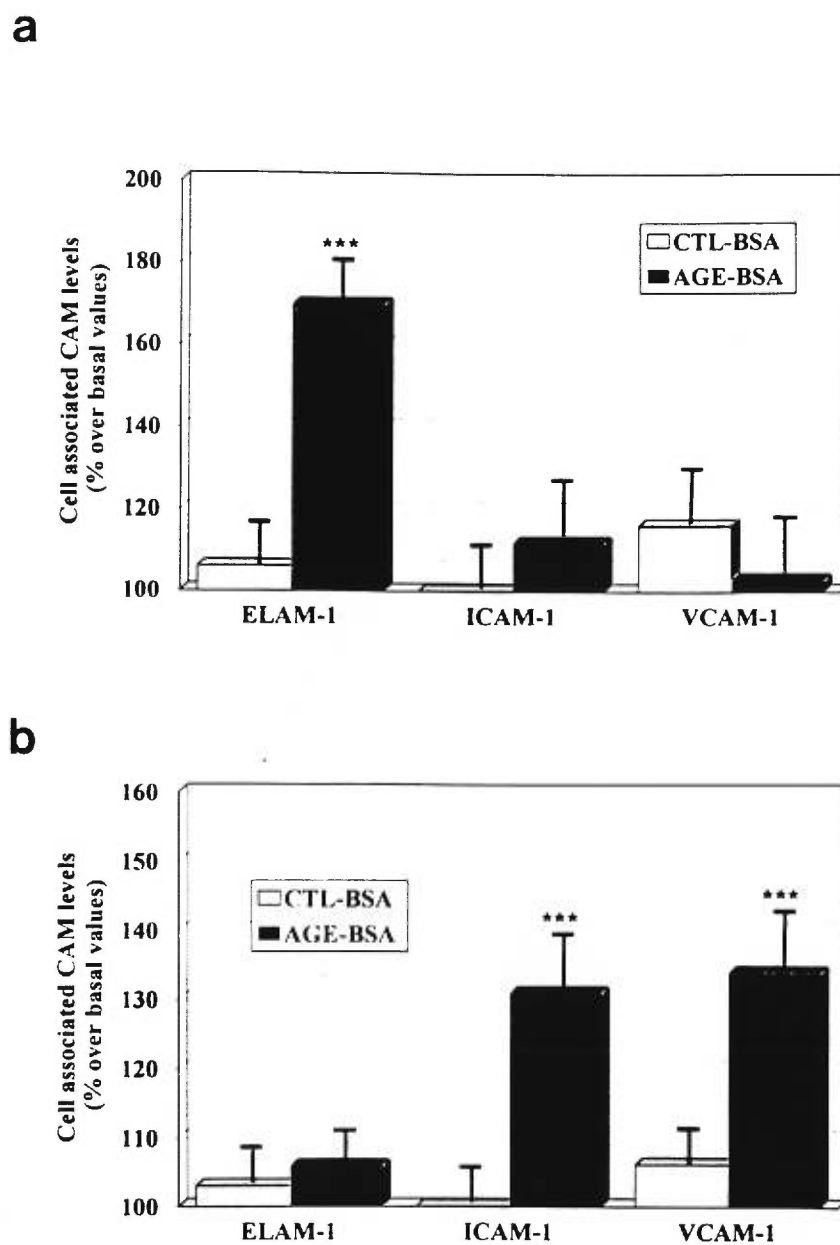


**Fig 1. Panel a: Effect of AGE-BSA on human monocyte adhesion to HUVECs.** HUVECs were incubated with AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) or native BSA (CTL-BSA, 100 $\mu$ g/ml) for 1 to 48 hours. At the end of the incubation period, monocyte adhesion to HUVECs was measured by the MPO assay. Results were expressed as % over basal values. Data represent mean  $\pm$  SEM of 5 different experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.005$  vs CTL-BSA.

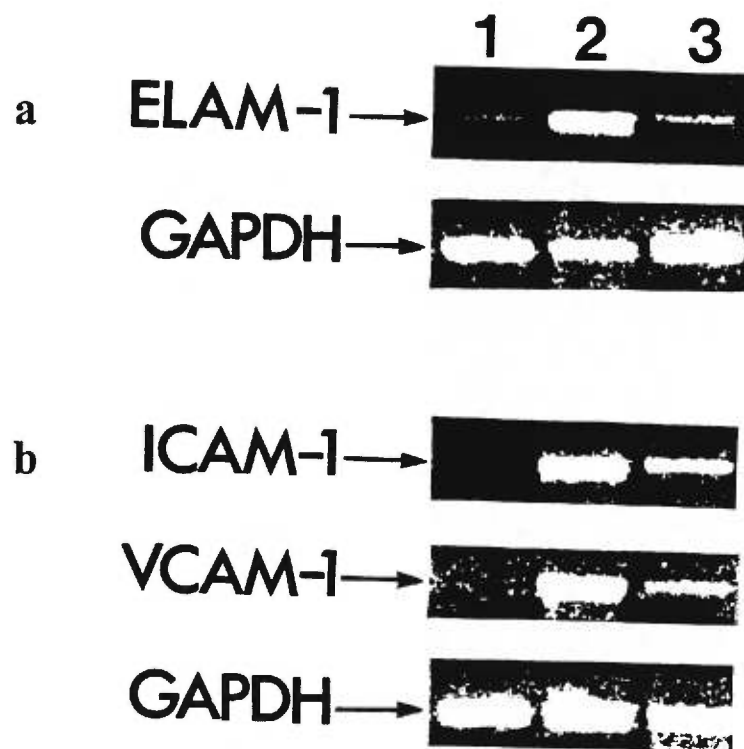
**Panel b: Effects of mAbs against endothelial cell adhesion molecules on AGE-BSA-stimulated monocyte adhesion to HUVECs.** HUVECs were incubated with mAbs against ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1 (10 $\mu$ g/ml), or with control anti-IgG (CTL, 10 $\mu$ g/ml), 1 hour prior to be treated with AGE-BSA (100  $\mu$ g/ml) for 4, 6 and 12 hours. At the end of the incubation period, monocyte adhesion to HUVECs was measured by the MPO assay. Results were expressed as % of control. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.005$  vs control values.

**a****b**

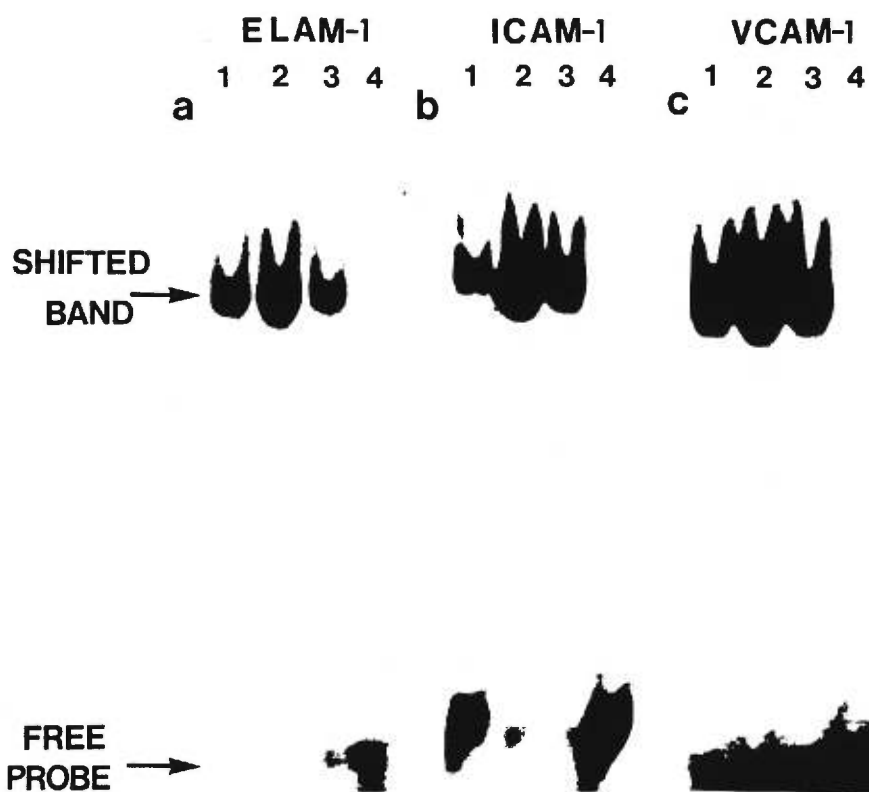
**Fig 2.** Effect of AGE-BSA on soluble cell adhesion molecule levels. HUVECs were treated for 4 hours (**panel a**) and 12 hours (**panel b**) with native BSA (CTL-BSA) or AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml). At the end of the incubation period, soluble levels of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 were measured in the supernatants of HUVECs. Results were expressed as % over basal values. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.005$  vs basal values.



**Fig 3.** Effect of AGE-BSA on endothelial cell-associated expression of adhesion molecules. HUVECs were treated for 4 hours (**panel a**) and 12 hours (**panel b**) with native BSA (CTL-BSA) or AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml). At the end of the incubation period, cell-associated expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 were measured. Results were expressed as % over basal values. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. \*\*\*,  $P < 0.005$  vs basal values.



**Fig 4. Effect of AGE-BSA on endothelial cell adhesion molecule mRNA levels. Modulatory effect of gliclazide.** HUVECs were treated for 4hours (panel a) or 12 hours (panel b) with native BSA (CTL-BSA) (lane 1), AGE-BSA (100µg/ml) (lane 2) or AGE-BSA (100µg/ml) in the presence of gliclazide (10µg/ml) (lane 3). At the end of the incubation period, mRNA levels of ELAM-1 (panel a), ICAM-1 and VCAM-1 (panel b) were measured by RT-PCR. Data represent the results of one representative experiment.



**Fig 5. Effect of AGE-BSA on NF- $\kappa$ B activation. Inhibitory effect of glyclazide.** Nuclear extracts were prepared from HUVECs treated for 4 hours (panel a) or 12 hours (panel b and c) with native BSA (CTL-BSA) (lane 1), AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) (lane 2) or AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) in the presence of glyclazide (10 $\mu$ g/ml) (lane 3). HUVEC nuclear extracts were also prepared and incubated with  $^{32}$ P-labeled NF- $\kappa$ B probe in the presence of an 100-fold excess of unlabeled NF- $\kappa$ B (lane 4). Nuclear protein binding to the NF- $\kappa$ B binding motif located in the ELAM-1 (panel a), ICAM-1 (panel b) and VCAM-1 (panel c) promoters was determined by EMSA. Data represent the result of one representative experiment.

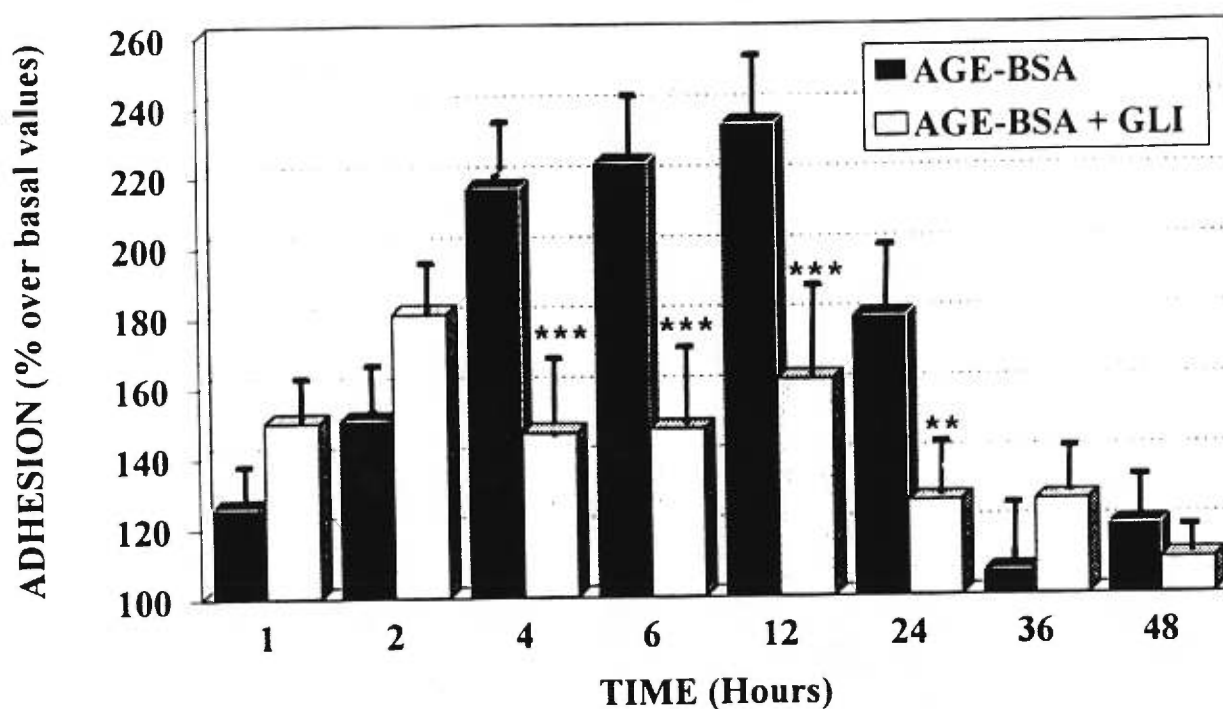
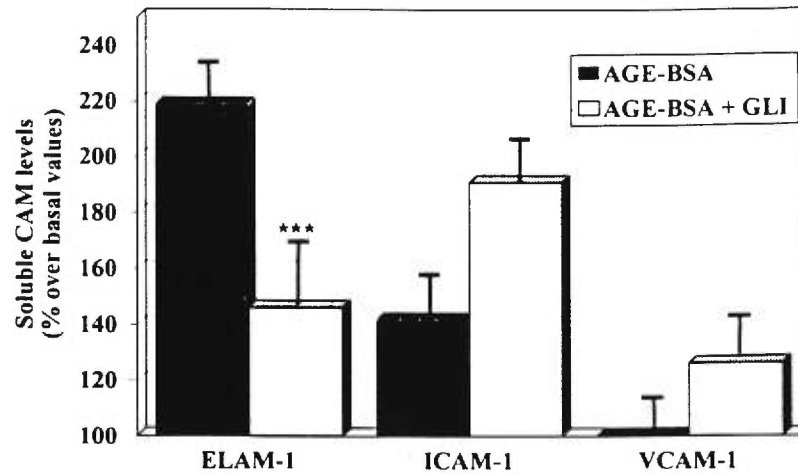
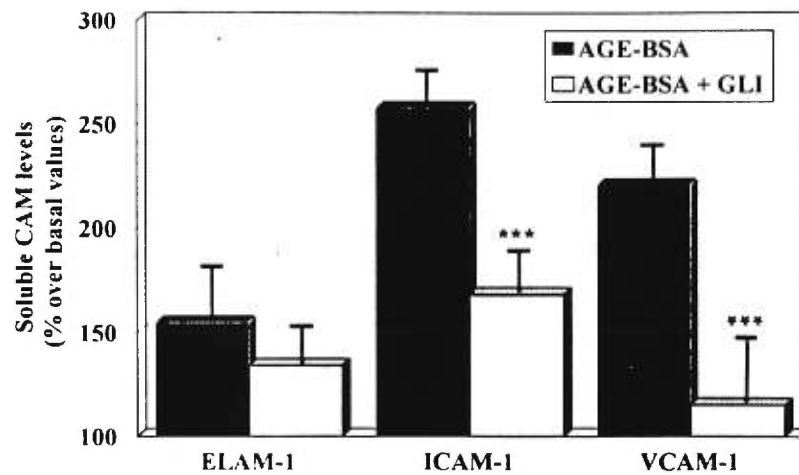


Fig 6. Effect of gliclazide on AGE-induced monocyte adhesion to HUVECs. HUVECs were incubated with AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) in the presence or absence of gliclazide (10 $\mu$ g/ml) for 1 to 48 hours. At the end of the incubation period, monocyte adhesion to stimulated HUVECs was measured by the MPO assay. Results were expressed as % over basal values. Data represent mean  $\pm$  SEM of 5 different experiments. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.005$  vs AGE-BSA alone.

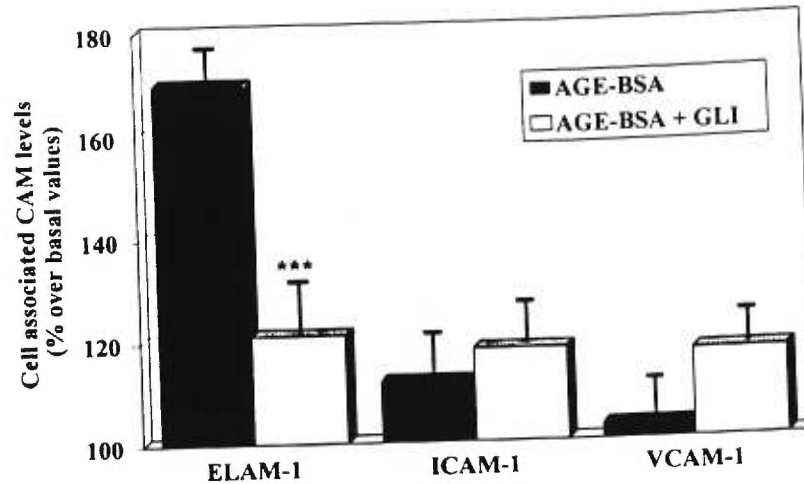
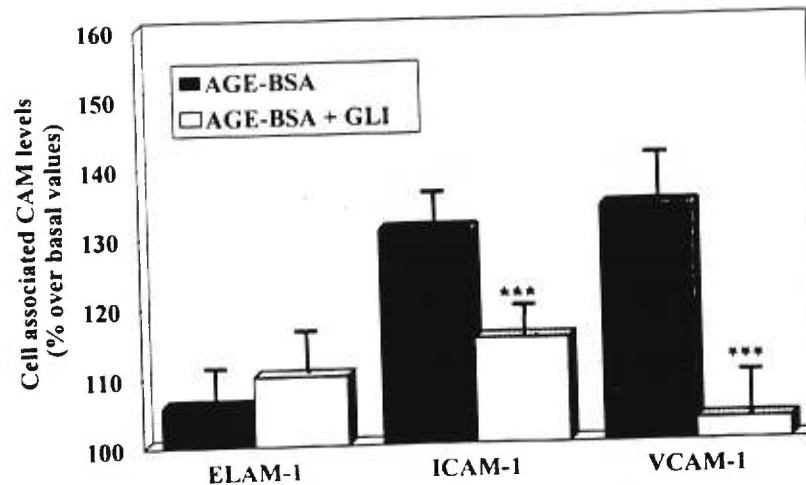


b



**Fig 7.** Effect of gliclazide on AGE-stimulated levels of soluble cell adhesion molecules. HUVECs were treated for 4 hours (**panel a**) and 12 hours (**panel b**) with AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) in the presence or absence of gliclazide (10 $\mu$ g/ml). At the end of the incubation period, soluble levels of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 were measured in the supernatants of HUVECs. Results were expressed as % over basal values. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. \*\*\*,  $P < 0.005$  vs basal values.



**a****b**

**Fig 8.** Effect of gliclazide on AGE-induced endothelial cell-associated adhesion molecules expression. HUVECs were treated for 4 hours (panel a) and 12 hours (panel b) with AGE-BSA (100 $\mu$ g/ml) in the presence or absence of gliclazide (10 $\mu$ g/ml). At the end of the incubation period, cell-associated levels of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 were measured. Results were expressed as % over basal values. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. \*\*\*,  $P < 0.005$  vs basal values.

---

### **III. DISCUSSION**

### **III.1 Anomalies contribuant au développement de l'athérosclérose dans le diabète de type 2**

Le DNID est associé à une augmentation de l'incidence des maladies cardio-vasculaires et à un développement précoce de l'athérosclérose (Nathan 1993). Chez les patients diabétiques, de nombreuses anomalies, notamment du métabolisme des lipides, des fonctions endothéliale, immunitaire et plaquettaire ont été décelées et contribuent au développement des complications vasculaires chez ces sujets (Schwartz et al, 1992; Nathan, 1993). De plus, le DNID est généralement associé à une obésité viscérale, une hyperinsulinémie, une insulino-résistance et une hypertension artérielle qui sont tous des facteurs de risque de développement des maladies cardio-vasculaires (Nathan, 1993).

#### **III.1.1 Métabolisme lipidique**

Dans le DNID, les anomalies du métabolisme lipidique se traduisent par une augmentation des niveaux plasmatiques des triglycérides et des VLDL et par une diminution des niveaux de HDL (Monnier et al, 1991; Oki, 1995). L'état d'insulino-résistance associé au DNID s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des VLDL et d'une diminution du catabolisme de ces lipoprotéines, imputable à une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (Monnier et al, 1991). Des anomalies au niveau de la composition des VLDL sont aussi notées, celles-ci étant plus grosses et enrichies en TG et en apo E peuvent en plus être glycosylées. De ces altérations résulte une accumulation de résidus de VLDL athérogènes au niveau de la paroi artérielle (Howard et Howard, 1994).

Dans le DNID, les LDL sont également des facteurs athérogéniques importants. Bien que les concentrations plasmatiques de LDL soient normales dans la population diabétique, des anomalies du métabolisme et de la composition des LDL y sont décelées (Abate et al, 1995). Le catabolisme des LDL isolées de patients diabétiques est diminué, les LDL sont petites et denses et peuvent être oxydées et glycosylées plus facilement que les LDL normales (Babiy et al, 1992). Ainsi, une anomalie généralement constatée chez les personnes diabétiques est le niveau sanguin plus élevé des produits de peroxydation lipidique (Sato et al, 1979). Les niveaux plasmatiques élevés de peroxydes lipidiques présents chez ces sujets, peuvent résulter d'une augmentation des niveaux de stress oxydatif et/ou d'une diminution du potentiel anti-oxydant faisant partie du système de défense naturel de l'organisme. Chez les patients diabétiques, les niveaux de cholestérol associé aux HDL sont généralement faibles par augmentation de leur clairance et de l'activité de la lipase hépatique, mais également par diminution de la clairance des VLDL et de l'activité de la lipoprotéine lipase (Harno et al, 1980). Ces anomalies au niveau des HDL entraînent une diminution du transport inverse du cholestérol, et du transfert des esters de cholestérol chez les patients diabétiques (Schwartz et al, 1992; Fielding et al, 1982). La composition des HDL peut également être altérée dans le DNID, notamment par glycosylation excessive de ces particules (Howard et Howard, 1994).

### **III.1.2 Fonction endothéliale et phénomènes d'adhésion**

La fonction de la cellule endothéliale est altérée dans le DNID. Cette altération se traduit par une augmentation de la réactivité vasculaire, due à une augmentation de la

production d'endothéline-1 vasoconstrictrice et à une diminution de la libération du monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur (Schwartz et al, 1992). D'autres anomalies fonctionnelles et structurales de la cellule endothéliale sont le résultat de l'hyperglycémie chronique. En effet, l'hyperglycémie, à long terme, peut induire des modifications au niveau des protéines, engendrant leur glycosylation (Brownlee et al, 1988; Haller et al, 1996). Ces produits de glycosylation irréversibles ou AGE s'accumulent dans l'organisme, et en particulier dans la paroi artérielle. La glycosylation existe de façon normale dans les phénomènes de vieillissement, mais elle est exagérée chez les patients diabétiques. Les AGE, par interaction avec leur récepteur, sont à l'origine de nombreuses altérations fonctionnelles au niveau de l'endothélium. Ainsi, les protéines glycosylées peuvent modifier les propriétés coagulantes de la surface des cellules endothéliales et augmenter la perméabilité des monocouches endothéliales, permettant ainsi le passage de macromolécules comme les LDL, qui vont alors s'accumuler dans l'espace sous-endothélial, où elles seront oxydées (Brownlee, 1992; Schwartz et al, 1992). Les AGE sont également à l'origine d'un épaissement de la membrane basale des cellules endothéliales. Il peut y avoir également transcytose du ligand glycosylé dans l'espace sous-endothélial, permettant ainsi le contact entre les protéines modifiées et les SMC, stimulant leur prolifération (Revue par Vlassara, 1994).

Dans le diabète mellitus, les interactions entre les monocytes et l'endothélium vasculaire sont exacerbées. En effet, les monocytes isolés de patients diabétiques de type I adhèrent plus aux cellules endothéliales en culture. De plus cette augmentation d'adhésion s'accompagne d'une élévation des niveaux plasmatiques des molécules d'adhésion solubles (Dosquet et al, 1992). Il y a notamment augmentation des niveaux d'ELAM-1 accompagnés

ou non de niveaux élevés d'ICAM-1 et/ou de VCAM-1 (Steiner et al, 1994; Cominacini et al, 1995 et 1997; Fasching et al, 1996). Plusieurs facteurs associés au DNID peuvent être impliqués dans l'augmentation de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales. Tout d'abord, les LDL oxydées peuvent augmenter la liaison des monocytes à l'endothélium vasculaire (Quinn et al, 1987). Ensuite, l'hyperglycémie chronique présente dans le DNID peut favoriser directement (Kim et al, 1994) ou indirectement, par l'intermédiaire des AGE, l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire (Schmidt et al, 1995). Enfin, l'hypertriglycéridémie caractérisant le DNID accroît également les propriétés adhésives des monocytes à l'endothélium vasculaire (Hoogerbrugge et al, 1996).

### **III.1.3 Fonction immunitaire**

Dans le DNID, l'immunité et les mécanismes de défense cellulaire sont altérés. Les patients atteints de DNID ont une fonction bactéricide et leucocytaire déficiente. La phagocytose macrophagique est également diminuée et cette altération semble jouer un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. En effet, la phagocytose macrophagique est un élément important dans la régression du noyau extracellulaire lipidique présent dans les stades précoces de l'athérosclérose (Bagdade, 1976; Schwartz et al, 1992).

Des données cliniques et expérimentales suggèrent que le système immunitaire puisse être impliqué dans le développement précoce de l'athérosclérose associée au diabète. Dans le DNID, les niveaux plasmatiques de  $\text{TNF}\alpha$  sont anormalement élevés (Nguyen et al, 1995; Hussain et al, 1996). Chez les patients souffrant de néphropathie diabétique, les

niveaux plasmatiques d'IL-6 sont également augmentés (Sekizuka et al, 1994).

Le TNF $\alpha$  semble jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose. En effet, ce facteur angiogénique favorise l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire en augmentant l'expression de l'antigène CD11b/CD18 à la surface membranaire des leucocytes (Salyer et al, 1990). Le TNF $\alpha$  induit aussi la synthèse et l'expression du facteur procoagulant par les cellules endothéliales, ce qui augmente leur perméabilité pour les macro-molécules comme les LDL oxydées (Revue par Lopes-Virella et Virella, 1996). Enfin, tout récemment, le TNF $\alpha$  a été impliqué dans l'induction de la résistance à l'insuline, trait caractéristique du DNID. Il semble que le TNF $\alpha$  diminue la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques et altère le signal de transduction du récepteur à l'insuline (Hotamisligil et al, 1994; Uysal et al, 1997). L'augmentation sélective de la production de TNF $\alpha$  par les monocytes dans le DNID suggère que le TNF $\alpha$  produit par ces cellules immunitaires puisse contribuer à la pathogenèse de l'athérosclérose associée au DNID.

Des observations récentes suggèrent enfin que divers facteurs de croissance, dérivant d'un grand nombre de cellules circulantes dont les plaquettes, les monocytes ou les lymphocytes T (Clemmons, 1991), puissent être impliqués dans certaines perturbations de la prolifération cellulaire existant dans le diabète, comme l'hyperplasie des cellules mésangiales et l'athérosclérose (Revue par Serri et Renier, 1995). La production tissulaire des facteurs de croissance qui fournissent un important moyen de coordination pour la croissance des cellules est augmentée dans le diabète. Les produits de glycosylation, retrouvés en quantité importante dans le DNID, peuvent augmenter la sécrétion de certains facteurs de croissance dont le PDGF $\beta$  et l'IGF-1 (Kirstein et al, 1990). Ainsi, l'augmentation de ces facteurs de croissance dans la paroi artérielle pourrait contribuer à la

progression de la plaque athéromateuse par stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses et de la synthèse des tissus conjonctifs.

#### **III.1.4 Fonction plaquettaire**

Les dernières anomalies associées au diabète touchent la thromborésistance endothéliale et la fonction plaquettaire. Ces facteurs sont importants dans la progression de l'athérosclérose et les événements cliniques qui en résultent, comme l'infarctus du myocarde (Schwartz et al, 1992). Le DNID est associé à une augmentation du facteur von Willebrand, à une diminution de la libération de prostacycline vasodilatatrice, et à une suppression de la thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales. Une altération de la fibrinolyse attribuable à la glycosylation de la fibrine est également observée (Revue par Schwartz et al, 1992). L'altération de la fonction plaquettaire se caractérise quant à elle, par une augmentation de l'adhésivité et de l'agrégabilité des plaquettes, associée à une surproduction de thromboxane A<sub>2</sub>, un facteur vasoconstricteur (Colwell et Lopes-Virella, 1988).

#### **III.2 Impact du traitement du DNID sur le développement des maladies cardio-vasculaires**

Le traitement du DNID inclut quatre approches différentes: le régime alimentaire, l'exercice, les hypoglycémifiants oraux et l'insuline. Une diète adaptée est un élément central dans le traitement du diabète car elle permet d'assurer un apport nutritionnel équilibré et adapté, et de minimiser les fluctuations extrêmes de la glycémie. Le régime alimentaire



peut également ralentir l'évolution de certaines complications vasculaires en réduisant les facteurs de risques vasculaires (Monnier et al, 1995). En effet, une perte de poids modérée (3 à 10 kg) peut améliorer les paramètres glycémiques et lipidiques, ainsi que le profil tensionnel des patients diabétiques (Monnier et al, 1995).

Un programme régulier d'exercice potentialise les effets du régime alimentaire en favorisant la dépense énergétique. L'exercice physique améliore l'action de l'insuline dans les muscles squelettiques, diminuant ainsi les besoins en insuline. L'exercice réduit également l'hypertension, la dyslipidémie, et certaines anomalies de coagulation, permettant ainsi de diminuer les facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires (Monnier et al, 1995; Céfalu, 1996).

Les hypoglycémiants oraux utilisés conjointement avec la diète et l'exercice, permettent quelque soit la classe de médicaments utilisée, de normaliser la glycémie, en retardant l'absorption du glucose alimentaire (inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase), en augmentant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques (biguanides) ou en restaurant la sécrétion de l'insuline (sulfonylurées). Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase, en plus de diminuer la glycémie et l'insulinémie postprandiales, améliorent le profil lipidique, ce qui peut contribuer à prévenir les complications vasculaires (Bischoff, 1993). De même, les biguanides, dont la metformine, ont, en dehors de leur action hypoglycémiante, la capacité de diminuer les concentrations d'insuline et du "plasminogen-activator inhibitor type I", ce qui en théorie pourrait réduire les risques de maladies cardio-vasculaires (Bailey et al, 1996). Parmi les hypoglycémiants, les sulfonylurées de seconde génération sont largement utilisées. Un membre de cette famille, le gliclazide, possède de nombreuses propriétés

métaboliques et vasculaires. En effet, outre son action bénéfique sur le contrôle glycémique, le gliclazide réduit l'hyperadhésion et l'hyperagrégabilité plaquettaires observées dans le DNID, et augmente l'activateur tissulaire du plasminogène. Le gliclazide est aussi un puissant antioxydant capable de réduire la production excessive de radicaux libres et de diminuer les niveaux plasmatiques élevés de peroxydes lipidiques présents chez les patients diabétiques (Florkowski et al, 1988; Jennings et al, 1992; Alberti, 1994). Ces effets, qui paraissent indépendants du contrôle glycémique ne sont pas exercés par les sulfonylurées de première génération, ni même par ceux de seconde génération comme le glyburide (Alberti, 1994).

La dernière approche dans le traitement du DNID est la thérapie à l'insuline. L'insuline possède des effets pro- et antiathérogéniques. L'hyperinsulinémie provoquée par une thérapie intensive à l'insuline peut favoriser la progression de la plaque athéromateuse en augmentant la synthèse de cholestérol et son transport dans les tissus artériels, et en stimulant la synthèse de lipides par les SMC et les cellules mononucléées. L'insuline stimule également la prolifération des SMC, augmente la synthèse de collagène dans la paroi artérielle, stimule la production de différents facteurs de croissance et favorise la progression de la plaque athéromateuse lipidique (Revue par Koivisto, 1993). Par contre, l'apport exogène d'insuline permet d'améliorer le contrôle de la glycémie et du profil lipidique. Ainsi, l'insuline réduit la lipolyse, ce qui diminue les concentrations sériques de glycérol et d'acides gras libres. Pendant une thérapie à l'insuline, les concentrations élevées de TG diminuent, ainsi que celles des VLDL et des LDL. L'insuline réduit enfin la glycosylation des protéines (Taskinen et al, 1988; Koivisto, 1993).

### **III.3 Effets du gliclazide sur certaines anomalies impliquées dans le développement des maladies cardio-vasculaires chez le sujet diabétique**

Plusieurs anomalies présentes dans le DNID peuvent être reproduites *in vitro*, permettant ainsi une étude plus aisée des mécanismes impliqués dans le développement de certaines pathologies associées au diabète, telle l'athérosclérose. Notre étude s'est composée de deux volets, une approche *in vitro* (Desfaits et al, 1997 et 1998b) et une approche *ex vivo* (Desfaits et al, 1998a). Avec l'aide de différents modèles *in vitro*, nous avons étudié l'effet modulateur du gliclazide sur la fonction monocytaire/macrophagique et endothéliale. Plus particulièrement, nous avons examiné les effets du gliclazide sur le processus d'oxydation des LDL et sur l'adhésion des monocytes à l'endothélium, stimulée par les LDL oxydées et les protéines glycosylées. Dans notre étude *ex vivo*, nous avons examiné l'effet de l'administration du gliclazide à des patients diabétiques, sur divers facteurs potentiellement responsables du développement des maladies cardio-vasculaires. Bien que les modèles *in vitro* et *ex vivo* ne reflètent pas fidèlement les situations *in vivo*, ils permettent néanmoins de fonder certaines hypothèses sur le rôle et les mécanismes d'action de certains facteurs proathérogéniques étroitement liés au diabète.

#### **III.3.1 Phénomènes d'oxydation**

##### **III.3.1.1 Étude *ex vivo***

Dans le DNID, une augmentation des niveaux de stress oxydatif est documentée (Baynes, 1991). L'augmentation des niveaux plasmatiques de peroxydes lipidiques

généralement observée chez les patients diabétiques, reflète cette anomalie (Sato et al, 1979). L'association entre les radicaux libres et l'athérosclérose est particulièrement importante dans le diabète, étant donné l'incidence accrue des maladies cardio-vasculaires dans cette pathologie (Jennings et al, 1992). Il a été démontré que l'administration de gliclazide pendant 3 à 6 mois à des patients diabétiques NID diminue de façon significative les concentrations plasmatiques élevées de peroxydes lipidiques, sans toutefois les normaliser (Jennings et al, 1992). Contrairement à l'étude de Jennings, nos résultats (Desfaits et al, 1998a), indiquent une normalisation complète des niveaux de peroxydes lipidiques chez les patients diabétiques, et ce, après 3 mois de traitement avec le gliclazide. Les raisons d'une telle différence entre les deux études restent inexplicées, et ne semblent pas être dues à la dose de gliclazide ou aux critères de sélection des patients diabétiques, les deux paramètres étant identiques dans les protocoles de recherche. Le point commun entre les deux études reste cependant le fait que le gliclazide possède *in vivo* des propriétés antioxydantes.

### III.3.1.2 Étude *in vitro*

L'augmentation des niveaux plasmatiques de peroxydes lipidiques observés dans le DNID peut résulter d'une augmentation de la sensibilité des lipoprotéines à l'oxydation ou d'une capacité accrue des monocytes à oxyder les LDL. Afin de déterminer le rôle des monocytes dans l'augmentation des concentrations plasmatiques de peroxydes lipidiques, nous avons étudié la capacité des monocytes isolés de patients diabétiques à oxyder les LDL. Nos résultats indiquent que des LDL, isolées de sujets contrôles, et incubées en présence de monocytes de patients diabétiques ou de témoins produisent des niveaux similaires de

produits réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS, un marqueur de la peroxydation lipidique) (Desfaits et al, 1998a). Ces résultats suggèrent que les monocytes ne sont pas des déterminants importants de l'oxydation des LDL dans le diabète et renforcent l'hypothèse que l'augmentation des niveaux plasmatiques de peroxydes lipidiques observés chez les patients diabétiques résulte d'une sensibilité exacerbée des lipoprotéines plasmatiques à l'oxydation.

Divers modèles expérimentaux peuvent être utilisés pour étudier les phénomènes d'oxydation des LDL. L'oxydation des LDL par les ions métalliques tels le cuivre ou le fer représente le modèle le plus couramment employé, au même titre que l'oxydation des LDL médiée par les cellules. L'étude de ces différents modèles est particulièrement intéressante lors de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'oxydation des LDL, chaque modèle impliquant des mécanismes qui lui sont propres. Dans un système *in vitro* sans cellules, le cuivre favorise l'oxydation des LDL en générant des radicaux libres comme les radicaux hydroxyles, qui vont initier l'oxydation des AGPI des LDL (Thomas et Jackson, 1991). Nous avons étudié les effets du gliclazide, *in vitro*, sur l'oxydation des LDL en présence de cuivre (Desfaits et al, 1997). Nos données, qui mettent en évidence un effet inhibiteur du gliclazide sur l'oxydation des LDL induite par cet agent, rejoignent celles de Luo et O'Brien (1996) démontrant que le gliclazide augmente la résistance des LDL à l'oxydation par le cuivre. Le gliclazide pourrait exercer son effet inhibiteur, en complexant les ions cuivriques, ou en piégeant les radicaux libres formés lors du processus d'oxydation, empêchant ainsi la phase de propagation de l'oxydation. Le gliclazide aurait alors les mêmes propriétés que d'autres antioxydants comme la vitamine E et le probucol qui ont la capacité d'inactiver les radicaux peroxydes ou de piéger les radicaux hydroxyles (Aviram, 1995;

Hoffman et Garewal, 1995). Les propriétés antioxydantes du gliclazide pourraient lui être conférées par la présence dans sa structure chimique d'un cycle azabicyclo-octyl qui lui est propre (Scott et al, 1991). Cette hypothèse est supportée par le fait que le glyburide, une autre sulfonylurée de seconde génération ne possédant pas cette structure, n'inhibe pas l'oxydation des LDL (Desfaits et al, 1997).

Les LDL peuvent également être oxydées par les cellules présentes dans la circulation et la paroi artérielle, dont les monocytes et les cellules endothéliales. Nous avons mis en évidence que le gliclazide inhibe l'oxydation des LDL médiée par les monocytes humains. Différents mécanismes semblent impliqués dans le processus d'oxydation des LDL par les monocytes. Alors que l'initiation de l'oxydation des LDL induite par les monocytes humains semble être liée, du moins dans certains cas, à la sécrétion de l'anion superoxyde (Cathcart et al, 1989), les phases subséquentes de propagation et d'amplification des réactions oxydatives semblent impliquer une voie nécessitant l'action des lipoxigénases cellulaires (Parthasarathy et al, 1989). Diverses études *in vitro* ont démontré que l'oxydation des LDL par libération de l'anion superoxyde requiert la présence de monocytes activés et ne se produit pas avec des monocytes non activés (Hiramastu et al, 1987; Cathcart et al, 1989). Ces observations sont en désaccord avec nos données, qui mettent en évidence que des monocytes non activés, en présence de cuivre, peuvent oxyder les LDL (Desfaits et al, 1997). Bien que les raisons d'une telle différence restent encore sans explication, il ne semble pas que le phénomène d'activation des monocytes, résultant de la méthode d'isolation utilisée dans notre étude, puisse rendre compte de l'effet observé. En effet, nous avons observé des niveaux indétectables ou très faibles d'anion superoxyde ou de  $\text{TNF}\alpha$  dans le

milieu de culture des monocytes fraîchement isolés. A partir de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans nos conditions expérimentales, l'oxydation des LDL médiée par des monocytes non activés, puisse impliquer une voie indépendante de l'anion superoxyde. Une étude récente a d'ailleurs proposé que l'oxydation des LDL puisse se faire par la libération dans le milieu de culture de thiols, qui en s'auto-oxydant, favoriseraient la peroxydation lipidique (Heinecke, 1994). Il est possible que l'effet inhibiteur du glioclazide sur l'oxydation des LDL médiée par les monocytes humains puisse se faire par diminution de la production de thiols, ou alternativement, par diminution de l'activité des lipoxygénases cellulaires (Rankin et al, 1991).

Outre les monocytes, les cellules endothéliales provenant de différentes espèces ont la capacité d'oxyder les LDL (Henriksen et al, 1981; Van Hinsbergh et al, 1986). Les données de la littérature concernant la capacité des cellules endothéliales provenant d'artères bovines (cellules BAE) à médier l'oxydation des lipoprotéines sont contradictoires. Alors que deux études indépendantes (Morel et al, 1984; Derian et Lewis, 1992) font état d'une absence d'oxydation des LDL par les cellules BAE, nous avons observé, en accord avec les résultats de Morgan et al. (1993), une oxydation des LDL, par les cellules BAE (Desfaits et al, 1997). Les mécanismes impliqués dans l'oxydation des LDL par les cellules endothéliales restent encore l'objet de nombreuses controverses. Alors que certaines études impliquent l'anion superoxyde dans ce processus (Morel et al, 1984; Van Hinsbergh et al, 1986), d'autres suggèrent plutôt la participation des lipoxygénases cellulaires (Parthasarathy 1989; Derian et Lewis, 1992). Les cellules BAE produisent peu d'anion superoxyde et ont un niveau élevé de catalase et de superoxyde dismutase (Parthasarathy et al, 1989), ce qui suggère que la voie principale d'oxydation des LDL par ces cellules serait plutôt celle des

lipoxygénases cellulaires.

Nous avons observé que les cellules BAE prétraitées avec le gliclazide montrent une capacité amoindrie à oxyder les LDL (Desfaits et al, 1997). Bien que l'effet protecteur maximal du gliclazide soit le même dans le cas des cellules endothéliales et des monocytes humains, les cellules BAE semblent cependant moins sensibles à cette substance que les monocytes. Cette différence de sensibilité entre les deux types de cellules pourrait s'expliquer par les mécanismes différents impliqués dans l'oxydation des LDL dans chacun de ces modèles expérimentaux. Bien que les mécanismes par lesquels le gliclazide protège les LDL de l'oxydation induite par les cellules BAE restent encore méconnus, le fait que celles-ci produisent peu d'anion superoxide pourrait suggérer que le gliclazide exerce son effet anti-oxydant en diminuant l'activité des lipoxygénases endothéliales présente dans la paroi artérielle. De plus, même si la diminution de l'oxydation des LDL n'est que de l'ordre de 20%, elle pourrait être suffisante pour influencer bénéfiquement le processus global de l'athérosclérose.

Nos résultats et ceux de la littérature, suggèrent que l'activité anti-oxydante du gliclazide observée *in vitro* à des concentrations comparables à celles retrouvées chez des patients diabétiques traités avec le gliclazide, pourrait également se manifester *in vivo*, au niveau de la paroi artérielle et/ou au niveau des plaques athéromateuses où des ions cuivriques sont présents et peuvent catalyser des réactions d'oxydation (Berliner et Heinecke, 1996).



### **III.3.2 Adhésion des monocytes aux cellules endothéliales**

Le processus d'adhésion des monocytes à l'endothélium implique l'expression d'une grande variété de molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium vasculaire et des monocytes circulants. Le clivage protéolytique du domaine extracellulaire des molécules d'adhésion lié à la surface de ces cellules génère la libération d'antigènes solubles dans le plasma ou dans le milieu de culture cellulaire où ils peuvent être facilement détectés (Gearing et Newman, 1993).

#### **III.3.2.1 Étude *ex vivo***

Des niveaux plasmatiques élevés de molécules d'adhésion solubles sont fréquemment présents chez les diabétiques et sont généralement associés au développement de l'athérosclérose chez ces patients (Gearing et Newman, 1993). Nous avons observé chez les patients diabétiques, une très forte augmentation de la concentration plasmatique d'ELAM-1, et des niveaux inchangés d'ICAM-1 et de VCAM-1 par rapport à notre groupe de témoins (Desfaits et al, 1998a). L'accroissement des niveaux de stress oxydatif présent dans le diabète pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion. Cette possibilité est supportée par les observations de Khan et al. (1995) et de Cerellio et al. (1996) qui ont démontré que les LDL modifiées augmentent l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales et que les niveaux circulants d'ICAM-1 chez les patients diabétiques sont en corrélation étroite avec les concentrations plasmatiques de malondialdéhyde, un index de peroxydation lipidique. Un rôle important du glucose dans

la régulation des molécules d'adhésion est aussi suggéré par les observations de Cominacini et al. (1995) montrant une forte corrélation entre l'expression d'ELAM-1 et le contrôle glycémique. En dépit de sa capacité à réduire les niveaux plasmatiques de peroxydes lipidiques, nous avons observé que l'administration du gliclazide à des sujets diabétiques, n'a pas modifié les concentrations plasmatiques des molécules d'adhésion chez ces patients. Etant donné l'absence d'effet du gliclazide sur le contrôle glycémique, il semble que le glucose puisse constituer un déterminant important de l'expression des molécules d'adhésion ou du moins de celle d'ELAM-1.

L'augmentation des niveaux circulants des molécules d'adhésion chez les sujets diabétiques suggère une altération possible du processus d'adhésion des monocytes à l'endothélium. Bien qu'une augmentation de l'adhésion des monocytes isolés de patients diabétiques de type 1 aux cellules endothéliales en culture ait été rapportée (Dosquet et al, 1992), il n'existait, à notre connaissance, au moment de notre travail, aucune étude portant sur l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales dans le DNID. En utilisant des cellules BAE en culture, nous avons étudié l'adhésivité spontanée de monocytes isolés de patients diabétiques NID et démontré une augmentation de l'adhésion de ces cellules à l'endothélium (Desfaits et al, 1998a). Puisque dans nos expériences, nous avons utilisé des cellules BAE en culture, les anomalies d'adhésion observées chez les patients diabétiques semblent devoir être reliées à des modifications d'expression des molécules d'adhésion exprimées à la surface des monocytes diabétiques. Cette hypothèse est supportée par l'étude de Setiadi et al. (1987) rapportant une surexpression de la molécule d'adhésion CD11b/CD18 ou Mac-1 à la surface de monocytes isolés de patients diabétiques. Cependant des altérations au niveau d'autres molécules exprimées à la surface des monocytes, comme

les intégrines ou les sélectines, pourraient également être impliquées dans cette anomalie.

Nous avons mis en évidence qu'un traitement de trois mois des sujets diabétiques NID avec le gliclazide, a ramené à des valeurs normales, les niveaux d'adhésion spontanée des monocytes de ces patients aux cellules BAE. Le gliclazide semble donc agir, dans un système *in vivo*, au niveau des molécules d'adhésion présentes à la surface des monocytes comme l'antigène CD11b/CD18 et le gliclazide présenterait alors les mêmes propriétés que la pentoxifylline, utilisée dans le traitement des maladies vasculaires périphériques. En effet, Dosquet et al. (1992) ont mis en évidence qu'un traitement *in vitro* de monocytes isolés de patients diabétiques avec de la pentoxifylline, aboutit à une diminution de l'expression de la molécule CD11b/CD18 et s'accompagne d'une diminution de l'adhésion des monocytes traités aux cellules endothéliales en culture.

La thérapie avec le gliclazide a permis de normaliser en quelques mois non seulement l'adhésion spontanée des monocytes diabétiques à l'endothélium, mais également les niveaux plasmatiques anormalement élevés de produits de peroxydation lipidique (Desfaits et al, 1998a). Cette observation suggère que l'effet du gliclazide sur l'expression des molécules d'adhésion monocytaires puisse être du à ses propriétés antioxydantes.

### **III.3.2.2 Étude *in vitro***

De nombreux facteurs impliqués dans les phénomènes d'inflammation, comme le  $TNF\alpha$  et certaines interleukines sont des inducteurs connus de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Scholz et al, 1996). D'autres molécules, comme les LDL oxydées, peuvent augmenter la liaison des monocytes à l'endothélium

vasculaire (Quinn et al, 1987), vraisemblablement par augmentation de l'expression de P-sélectine (Gebuhrer et al, 1995), ICAM-1 et VCAM-1 (Cominacini et al, 1997) ou ELAM-1 (Okada et al, 1995). Nos résultats démontrent que l'oxydation des LDL médiée par des cellules BAE est associée à une augmentation significative de l'adhésion des monocytes à ces cellules (Desfaits et al, 1997). L'effet inhibiteur du gliclazide sur l'augmentation d'adhésion des monocytes aux cellules BAE, en présence de LDL, laisse à penser que le gliclazide puisse exercer cet effet inhibiteur en bloquant l'oxydation des LDL et/ou en modulant l'expression de certaines molécules d'adhésion endothéliales, induites par les LDL oxydées dont ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1 et P-sélectine.

Outre les LDL oxydées, les AGE semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium. Il a été récemment démontré par Vlassara et al. (1995) que les AGE pouvaient induire l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 dans des athéromes de lapin. Schmidt et al. (1995) ont aussi récemment rapporté que l'interaction de l'albumine bovine glycosylée (BSA-AGE) avec son récepteur à la surface des cellules endothéliales en culture induisait l'expression de VCAM-1. Ces auteurs ont notamment rapporté une augmentation de l'adhésion des cellules Molt-4, une lignée lymphoblastique humaine immortalisée, à des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) en culture traitées avec de la BSA-AGE. Nous avons confirmé ces résultats en démontrant que la BSA-AGE induit l'adhésion des monocytes humains aux HUVEC et aux cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) en culture traitées avec de la BSA-AGE (Desfaits et al, 1998b).

Dans nos expériences, nous avons utilisé, contrairement à Schmidt et al. (1995), des monocytes humains, cellules connues pour jouer un rôle important dans la genèse de

l'athérosclérose associée au DNID. Notre modèle d'adhésion *in vitro*, qui utilise des monocytes humains fraîchement isolés, semble mieux refléter une situation *in vivo* qu'une lignée immortalisée de lymphoblastes. Nous avons étudié la cinétique d'action de la BSA-AGE en exposant les HUVEC pendant des temps variables à une concentration fixe de BSA-AGE (100µg/ml). Nous avons mis en évidence que la BSA-AGE induit une adhésion dépendante du temps, des monocytes aux cellules endothéliales, qui est maximale après 4, 6 et 12 heures de traitement des HUVEC avec la BSA-AGE. Ces résultats sont différents de ceux de Schmidt et al. (1995) qui observent dans leur système, un maximum d'adhésion des cellules Molt-4 après 2 heures seulement de traitement des HUVEC avec de la BSA-AGE et un retour à des valeurs basales après 12 heures.

Afin d'identifier les mécanismes responsables de l'augmentation de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales induite par la BSA-AGE, nous avons étudié l'expression de diverses molécules d'adhésion pouvant être impliquées dans le processus d'interaction monocytes-cellules endothéliales telles ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1 (revue par Elangbam, 1997). Alors que ELAM-1 semble impliquée dans le premier contact ("tethering") entre les cellules endothéliales et les monocytes, VCAM-1 et ICAM-1 apparaissent contribuer à un attachement plus ferme des monocytes à l'endothélium vasculaire (Springer, 1994). En accord avec ces données, nous avons observé que l'induction d'ELAM-1 au niveau génique (augmentation de la transcription de l'ARN messager ou augmentation de sa stabilité) et protéique est responsable de l'augmentation précoce (4 à 6 heures) de l'adhésion des monocytes aux HUVEC induite par la BSA-AGE et que celle de ICAM-1 et VCAM-1, également au niveau génique et protéique, est à l'origine de l'augmentation plus tardive (12 heures) de l'adhésion stimulée des monocytes aux

HUVEC (Desfaits et al, 1998b). Ces observations suggèrent que les AGE peuvent agir au moins dans deux étapes cruciales de l'adhésion des monocytes; celle du premier contact et celle de l'attachement ferme.

Les cinétiques d'induction de ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1 par la BSA-AGE sont très proches de celles rapportées pour d'autres stimuli. En effet, les données de la littérature indiquent qu'une stimulation des cellules endothéliales par diverses cytokines induit l'expression d'ELAM-1, avec un maximum atteint après 4 à 6 heures de traitement et un retour à une valeur basale après 12 heures. Pour VCAM-1, le maximum d'expression en réponse aux mêmes stimuli se situe aux alentours de 6 à 10 heures et disparaît après 48 à 72 heures. Enfin, ICAM-1 est exprimée de façon maximale après 6 à 12 heures de stimulation et reste élevée jusqu'à 72 heures au moins (Scholtz, 1996). Ces cinétiques d'expression des CAM concordent avec le maximum d'adhésion des monocytes aux HUVEC que nous avons observé après 4 à 12 heures de stimulation avec la BSA-AGE et avec le retour subséquent aux valeurs basales.

Dans notre étude, nous avons rapporté qu'il semble exister une association entre les niveaux des molécules d'adhésion solubles détectés dans le milieu de culture et ceux des molécules associées aux cellules endothéliales. Ces résultats laissent à penser que les niveaux solubles élevés des molécules d'adhésion, facilement mesurables *in vivo*, pourraient refléter des anomalies au niveau des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, des concentrations anormalement élevées de molécules d'adhésion comme VCAM-1 pourraient servir de marqueur d'un dommage endothélial ou d'une perturbation vasculaire dans le diabète (Schmidt et al, 1995; Fasching et al, 1996).

De plus en plus d'évidences suggèrent que le stress oxydatif résultant de l'interaction

de la BSA-AGE avec son récepteur à la surface des cellules endothéliales puisse être responsable de l'induction de VCAM-1 (Schmidt et al, 1995). Ce stress oxydatif se traduit par une augmentation de la formation de substances oxygénées réactives (Mullarkey et al, 1990; Baynes, 1991), d'une augmentation de l'expression de l'ARN messager de l'oxygénase présente dans l'hème, et de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Yan et al, 1994).

Le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription associé à l'expression génique précoce, localisé dans le cytoplasme des cellules endothéliales quiescentes. Il est alors sous forme inactive, lié à sa protéine inhibitrice I $\kappa$ B- $\alpha$ . Lors de l'activation des cellules endothéliales par des cytokines ou par d'autres molécules, la protéine I $\kappa$ B- $\alpha$  est phosphorylée, conduisant à sa dissociation du dimère NF- $\kappa$ B. Le dimère devient alors actif et migre jusqu'au noyau de la cellule, où il se lie à sa séquence cible sur l'ADN et active la transcription (revue par Ferran et al, 1995). Des séquences auxquelles le NF- $\kappa$ B peut se lier, sont présentes dans le promoteur des gènes de VCAM-1, ELAM-1 et ICAM-1 (Collins et al, 1995).

Nous avons démontré dans notre étude (Desfaits et al, 1998b), que la BSA-AGE induit une augmentation de l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B responsable de l'augmentation de l'expression génique des molécules d'adhésion. Contrairement aux résultats de Schmidt et al. (1995) qui démontrent une activation du facteur de transcription présent seulement dans le gène de VCAM-1, nos données indiquent que la BSA-AGE augmente aussi l'expression de ELAM-1 et ICAM-1, en induisant une activation du NF- $\kappa$ B.

D'après les résultats précédents, nous pouvons supposer que *in vivo*, les AGE présents dans la paroi artérielle pourraient stimuler l'endothélium adjacent, entraînant au niveau de ce site, une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion. Cet effet pourrait avoir comme conséquence d'accroître la liaison des monocytes circulants à

l'endothélium vasculaire. Comme les AGE s'accumulent dans la paroi artérielle de façon prolongée, leurs effets sur l'expression endothéliale de diverses molécules d'adhésion pourraient être amplifiés et/ou combinés à d'autres stimuli qui modulent les molécules d'adhésion comme les cytokines (Poher et Cotran, 1990).

Nous avons mis en évidence que le gliclazide possède des propriétés anti-oxydantes. En particulier, nous avons démontré qu'il inhibe l'adhésion des monocytes à l'endothélium, induite par les LDL oxydées et la BSA-AGE. Nous avons documenté dans notre dernière étude que le gliclazide module aussi l'expression des molécules d'adhésion solubles et associées aux cellules endothéliales, induite par la BSA-AGE. En effet, nous avons observé une inhibition sélective de l'expression génique et protéique d'ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1 induite par la BSA-AGE par cette sulfonylurée (Desfaits et al, 1998b). Cet effet est associé à une inhibition spécifique de la liaison des protéines nucléaires au site de NF- $\kappa$ B présent dans le promoteur de ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec divers anti-inflammatoires ou antioxydants comme l'aspirine (Weber et al, 1995) ou le pyrrolidine dithiocarbamate (Weber et al, 1994) qui inhibent de façon sélective l'activation du NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  ou la LPS au niveau des cellules endothéliales. Le gliclazide, comme l'aspirine pourrait agir en piégeant les radicaux libres, conduisant à une diminution de la libération du NF- $\kappa$ B actif dans les cellules endothéliales.

### **III.3.3 Cytokines et facteurs de croissance**

Dans le DNID, les niveaux de TNF $\alpha$  sont généralement élevés, et cette cytokine semble avoir un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose associée au diabète



(revue par Lopes-Virella et Virella, 1996). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation légère mais significative, de la concentration de TNF $\alpha$  plasmatique, et une augmentation plus marquée des niveaux d'IL-6 sérique chez les patients diabétiques (Desfaits et al, 1998a). Les facteurs induisant un accroissement des niveaux plasmatiques de ces cytokines dans le DNID restent encore mal définis, et pourraient inclure le glucose (Mooradian et al, 1991), les AGE (Vlassara et al, 1988; Morohoshi et al, 1995) ou les LDL oxydées (Jovinge et al, 1996).

Le monocyte/macrophage représentant la source principale de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, nous avons également étudié la production *in vitro* de cytokines par ces cellules. En accord avec l'étude d'Ohno et al. (1993), nous avons observé que les monocytes isolés de patients diabétiques produisent des quantités basales identiques de TNF $\alpha$  que les monocytes isolés de sujets témoins. La production monocyttaire de TNF $\alpha$  stimulée par de la LPS est par contre plus importante chez les patients diabétiques que chez les sujets contrôles.

Excepté l'augmentation de la sécrétion de TNF $\alpha$ , nous n'avons pas documenté d'altération de la production stimulée d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-8 dans le groupe de patients diabétiques. Ces résultats suggèrent que la production monocyttaire de TNF $\alpha$  est sélectivement altérée chez les patients diabétiques (Desfaits et al, 1998a).

L'augmentation de la production stimulée de TNF $\alpha$  par les monocytes de patients diabétiques est inhibée par un traitement de 3 mois avec le gliclazide. Cet hypoglycémiant, en diminuant la surproduction de TNF $\alpha$  induite par la LPS, pourrait avoir un effet bénéfique en terme de prévention des complications vasculaires liées au DNID comme l'athérosclérose. En effet, il a été démontré que les infections bactérielles aiguës pourraient jouer un rôle dans les lésions de l'endothélium artériel (Wissler, 1977). En outre, en

postulant que la surproduction de  $TNF\alpha$  en réponse à la LPS traduise une capacité d'activation excessive de ces cellules par divers autres stimuli, il est possible que le gliclazide puisse exercer un effet immunosuppresseur similaire sur la production de  $TNF\alpha$  induite par d'autres cytokines exprimées dans la lésion athéromateuse.

Divers facteurs de croissance semblent impliqués dans les perturbations de la prolifération cellulaire associées au diabète. Nous avons donc mesuré chez nos patients diabétiques, les niveaux sériques d'un certain nombre de facteurs de croissance potentiellement proathérogéniques. Nos résultats montrent que les niveaux plasmatiques des facteurs de croissance, incluant IGF-1, VEGF, FGFb et  $TGF\beta$  sont identiques dans le groupe de patients diabétiques et de contrôles. Ces données indiquent que l'hyperglycémie *in vivo* n'est pas associée à une augmentation des niveaux sériques de ces facteurs et que leur mesure n'est pas pertinente au niveau clinique.

---

#### **IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## IV.1 Conclusions

Outre son action hypoglycémisante, le gliclazide possède des effets anti-oxydant et inhibiteur sur l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire. Un traitement à court terme de patients diabétiques avec le gliclazide, permet:

- 1) de normaliser les niveaux plasmatiques élevés de peroxydes lipidiques observés chez ces patients,
- 2) de réduire l'adhésion spontanée des monocytes isolés de ces patients et de les ramener à des niveaux comparables à ceux observés chez les sujets témoins,
- 3) de diminuer la production monocyttaire *in vitro* stimulée par la LPS.

Nos études *in vitro*, ont permis de démontrer que le gliclazide inhibe de façon spécifique l'oxydation des LDL médiée par les cellules endothéliales, les monocytes et le cuivre. Ces études nous ont également permis de documenter un effet inhibiteur du gliclazide sur l'adhésion des monocytes humains aux cellules endothéliales en culture, induite par les LDL oxydées et la BSA glycosylée. Finalement, elles ont démontré un effet inhibiteur du gliclazide sur l'expression des molécules d'adhésion ELAM-1, ICAM-1 et VCAM-1 due à une diminution de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

Les phénomènes d'oxydation des lipoprotéines et d'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire jouent des rôles cruciaux dans le développement des pathologies vasculaires liées au DNID. Pris globalement, nos résultats suggèrent qu'un traitement des patients diabétiques avec le gliclazide pourrait être bénéfique dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose associée au DNID.

## IV.2 Perspectives

Les mécanismes impliqués dans le développement précoce de l'athérosclérose observée chez les patients diabétiques sont complexes et demeurent obscurs. Il est à espérer que la recherche menée dans ce domaine puisse contribuer à élucider les mécanismes responsables du développement des complications vasculaires dans le diabète mellitus.

Bien que l'approche *in vitro* constitue un atout indéniable pour étudier les processus existant *in vivo* comme l'oxydation des lipoprotéines ou l'adhésion des leucocytes, l'extrapolation de leurs résultats à une situation *in vivo* n'est pas aisée et demande la plus grande prudence. Ainsi, le modèle d'adhésion *in vitro* ne tient pas compte des molécules d'adhésion exprimées par l'endothélium vasculaire dans un état pathologique comme le diabète, et les études *in vitro* ne reflètent qu'une simulation d'un état diabétique. L'idéal serait de pouvoir développer des modèles expérimentaux plus proches du micro-environnement que représente la paroi artérielle diabétique en essayant de recréer les interactions existant entre l'endothélium et l'espace sous-endothélial par exemple.

Le gliclazide est un médicament très prometteur pour ses propriétés anti-oxydantes et sa capacité de diminuer l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire. Il serait intéressant d'étudier les effets du gliclazide sur d'autres composantes de l'athérosclérose, comme le recrutement des monocytes ou la prolifération des cellules musculaires lisses. Il pourrait aussi être pertinent d'examiner, dans le futur, la capacité du gliclazide à réduire

certaines paramètres, présents dans l'athérosclérose, tels:

- 1) l'expression de la protéine chémoattractrice pour les monocytes ou MCP-1 par les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses,
- 2) la migration des monocytes induite par la MCP-1,
- 3) l'effet des facteurs de croissance induisant non seulement la prolifération mais aussi la migration des cellules musculaires lisses de la media vers l'intima.

Enfin, il serait très intéressant d'étudier les effets d'un traitement à long terme par le gliclazide sur le développement et la progression de l'athérosclérose associée au DNID.

En conclusion, de nombreux champs d'investigation restent à explorer quand aux effets du gliclazide sur le développement des complications vasculaires associées au DNID et pourraient constituer un excellent sujet de doctorat !

---

## V. RÉFÉRENCES

- Abate N, Vega GL, Garg A, Grundy S: Abnormal cholesterol distribution among lipoprotein fractions in normolipidemic patients with mild NIDDM. *Atherosclerosis* 118:111-122, 1995
- ADA: Office guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes Care* 19:S4-S7, 1996
- Akkus I, Kalak S, Vural H, Caglayan O, Menekse E, Can G, Durmus B: Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamine C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 244:221-227, 1996
- Alberti KGMM: Gliclazide: revue des actions métaboliques et vasculaires. *Diabetes Metab* 20:341-348, 1994
- Alzaid AA: Microalbuminuria in patients with NIDDM: an overview. *Diabetes Care* 19:79-89, 1996
- Ashcroft FM: Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. *Horm Metab Res* 28:456-463, 1996
- Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett KC, Krauss RM: Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *J Am Med Assoc* 260:1917-1921, 1988
- Auerbach BJ, Bisgaier CL, Wolle J, Saxena U: Oxidation of low density lipoproteins greatly enhances their association with lipoprotein lipase anchored to endothelial cell matrix. *J Biol Chem* 271:1329-1335, 1996
- Aviram M: Oxidative modification of low density lipoprotein and its relation to atherosclerosis. *Isr J Med Sci* 31:241-249, 1995
- Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR, Willey K: Increased oxidizability of plasma lipoproteins in diabetic patients can be decreased by probucol therapy and is not due to glycation. *Biochem Pharmacol* 43:995-1000, 1992
- Bagdade JD: Phagocytic and microbicidal function in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 205:27-34., 1976
- Bailey CJ, Path MRC, Turner RC: Metformin. *New Engl J Med* 334:574-579, 1996



- Barnett AH, Eff C, Leslie RDG: Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20:87-93, 1981
- Basha BJ, Sowers JR: Atherosclerosis: an update. *Am Heart J* 131:1192-1202, 1995
- Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Gessl A, Waldhausl: Modulation by high glucose of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. *Diabetologia* 38:1367-1370, 1995
- Baynes JW: Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991
- Beck-Nielsen H, Henriksen JE, Vaag A, Hother-Nielsen O: Pathophysiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Res Clin Pract* 28:S13-S25, 1995
- Beekhuizen H, van Furth R: Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J Leukoc Biol* 54:363-378, 1993
- Berliner JA, Territo MC, Navab M, Andalibi A, Parhami F, Liao F, Kim J, Estworhty S, Lusis AJ, Fogelman AM: Minimally modified lipoproteins in diabetes. *Diabetes* 41:74-76, 1992
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ: Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 91:2488-2496, 1995
- Berliner JA, Heinecke JW: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med* 20:707-727, 1996
- Bevilacqua MP, Gimbrone MA: Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 13:425-433, 1987
- Bilato C, Crow MT: Atherosclerosis and the vascular biology of aging. *Aging Clin Exp Res* 8:221-234, 1996
- Bischoff H: Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Drugs in development* 1:3-13, 1993
- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *New Engl J Med* 318:1315-1321, 1988
- Brownlee M: Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 15:1835-1843, 1992

- Brun JM, Drouin P, Berthezene F, Jacoto B, Pometta D: Dyslipidémies du patient diabétique. *Diabete Metab* 21:59-62, 1995
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H: Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6434-6438, 1993
- Bunn HF, Higgins PJ: Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 213:222-224, 1981
- Byrne MM, Sturis J, Polonsky KS: Insulin secretory defects in prediabetes (abstract). *Diabetes* 44:195A, 1995
- Capron L: Athérosclérose et complications cardio-vasculaires du diabète. *Annales d'Endocrinologie* 57:161-165, 1996
- Castelli W, Doyle JT, Gordon T: HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease: the Cooperative lipoprotein phenotype study. *Circulation* 55:767-772, 1977
- Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM: Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J Leukoc Biol* 38:341-350, 1985
- Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM: Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol* 142:1963-1969, 1989
- Cavallero E, Piolot A, Jacotot B: Postprandial lipoprotein clearance in type 2 diabetes: fenofibrate effects. *Diabetes Metab* 21:118-120, 1995
- Cefalu WT: Treatment of type II diabetes. *Postgraduate Medicine* 99, 1996
- Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P: High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 45:471-477, 1996
- Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL: Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 27:97-108, 1997
- Chiasson JL, Hamet P, Verdy M: The effect of Diamicon on the secretion and action of insulin. *Diabetes Res Clin Pract* 14:S47-S52, 1991
- Clauser E, Auzan C, Leconte I: Le récepteur de l'insuline. *Annales d'Endocrinologie* 56:515-521, 1995

- Clemmons DR: Role of peptide growth factors in development of macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 14:153-156, 1991
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9:899-909, 1995
- Colwell JA, Lopes-Virella MF: A review of the development of large-vessel disease in diabetes mellitus. *Am J Med* 85:113-118, 1988
- Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti MG, Moghetti P, Lo Cascio V: Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* 38:1122-1124, 1995
- Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Campagnola M, Davoli A, Rigoni A, Zenti MG, Pastorino AM: E-selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress. *Diabetologia* 40:584-589, 1997
- Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Contessi GB, Pastorino AM, Lo Cascio V: Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 22:117-127, 1997
- Cushing S, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 87:5134-5138, 1990
- Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW: Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94:437-444, 1994
- De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E: Pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care* 15:318-368, 1992

- De Man FHAF, Cabezas MC, van Barlingen, Erkelens DW, de Bruin TWA: Triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin dependent diabetes mellitus: post-prandial metabolism and relation to premature atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 26:89-108, 1996
- Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A: Albuminuria reflects wide spread vascular damage: the Steno hypothesis. *Diabetologia* 32:219-226, 1989
- Deckert T, Borch-Johnsen K, Grenfell A: Epidemiology and natural history of diabetic nephropathy. In: *Chronic complications of diabetes*. Edited by JC. Pickup & G. Williams. Blakwell scientific publications. London. p 139-145, 1994
- Dejager S, Turpin G: Athérogénicité des lipoprotéines de basse densité (LDL). Un problème de quantité ou de qualité ? *Presse Med* 24:1772-1776, 1995
- Derian CK, Lewis DF: Activation of 15-lipoxygenase by low density lipoprotein in vascular endothelial cells. Relationship to the oxidative modification of low density lipoprotein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45:49-57, 1992
- Desfaits AC, Serri O, Renier G: Gliclazide decreases cell-mediated low density lipoprotein (LDL) oxidation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidatively modified LDL. *Metabolism* 46:1150-1156, 1997
- Desfaits AC, Serri O, Renier G: Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion and tumor necrosis factor alpha production in NIDDM patients following gliclazide treatment. *Diabetes Care*, in press, 1998a
- Desfaits AC, Serri O, Renier G: Glyclazide reduces the induction of human monocyte adhesion to endothelial cells by advanced glycation end products. Submitted to *Diabetologia*, 1998b
- Dosquet C, Weill D, Wautier JL: Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Hematol* 34:S55-59, 1992
- Durrington P: *Preventive cardiology*, Eds:Dunitz M, London, United Kingdom, 1993
- Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR: Cell adhesion molecules-update. *Vet Pathol* 34:61-73, 1997
- Erhenwald E, Chisolm GM, Fox PL: Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low-density lipoproteins. *J Clin Invest* 93:1493-1501, 1994

- Eschwege E, Balkau B, Fontbonne A: The epidemiology of coronary heart disease in glucose-intolerant and diabetic subjects. *J Intern Med* 236:5-11, 1994
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G: The role of peroxidation and anti-oxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 13:341-390, 1992
- Esterbauer H, Schmidt R, Hayn M: Relationships among oxidation of low-density lipoprotein, antioxidant protection and atherosclerosis. *Advances in Pharmacology* 38:425-456, 1997
- Fajans SS: Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care* 13:49-64, 1990
- Fasching P, Veitl M, Rohac M, Strelci C, Schneider B, Waldhausl W, Wagner OF: Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with macrovascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4313-4317, 1996
- Faull RJ: Adhesion molecules in health and disease. *Aust NZ J Med* 25:720-730, 1995
- Feingold KR, Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Krauss L: LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Arterioscler Thromb* 12:1496-1502, 1992
- Feldman EB: Nutrition and diet in the management of hyperlipidemia and atherosclerosis. Dans: *modern nutrition in health and disease*. Eds: Shils ME, Olson JA and Shike M, Philadelphia, USA, 1994
- Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler H: Inhibition of NF- $\kappa$ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 214:212-223, 1995
- Fielding CJ, Castro GR, Donner C, Fielding PE, Reaven GM: Distribution of apolipoprotein E in the plasma of insulin dependent and non insulin dependent diabetes and its relation to cholesterol. *J Lipid Res* 27:1052-1061, 1986
- Fontbonne A: Insulin-resistance syndrome and cardiovascular complications of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 22:305-313, 1996

- Florkowski CM, Richardson MR, Le Guen C, Jennings PE, O'Donnell MJ, Jones AF, Lunec J, Barnett AH: Effect of gliclazide on thromboxane B<sub>2</sub>, parameters of haemostasis, fluorescent IgG and lipid peroxides in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res* 9:97-90, 1988
- Frostegard J, Wu R, Haegerstrand A, Patarroyo M, Lefvert AK, Nilsson J: Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low-density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. *Atherosclerosis* 103:213-219, 1993
- Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EM: Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 75:181-189, 1994
- Garg A: Insulin resistance in the pathogenesis of dyslipidemia. *Diabetes Care* 19:387-389, 1996
- Garner B, Dean RT, Jessup W: Human macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein is delayed and independent of superoxide production. *Biochem J* 301:421-428, 1994
- Gearing AJH, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14:506-512, 1993
- Gebuhrer V, Murphy JF, Bordet JC, Reck MP, McGregor JL: Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. *Biochem J* 306:293-298, 1995
- Gerich JE: Pathogenesis and treatment of type 2 (noninsulin-dependent) diabetes mellitus (NIDDM). *Horm Metab Res* 28:404-412, 1996
- Gille J, Swerlick RA, Lawley TJ, Caughman SW: Differential regulation of vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription by tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\alpha$  in dermal microvascular endothelial cells. *Blood* 87:211-217, 1996
- Ginsberg HN: Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states, relationship to atherogenesis. *Diabetes Care* 14(9):839-855, 1991
- Girard J: Insulinorésistance: quel rôle dans le diabète de type 2? *Diabete et Metab* 20:330-336, 1994

- Guillausseau PJ, Lubetzki J: Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. *Ann Med Interne* 147:87-92, 1996
- Haller H, Drab M, Luft FC: The role of hyperglycemia and hyperinsulinemia in the pathogenesis of diabetic angiopathy. *Clin Nephrol* 46:246-255, 1996
- Harlan JM, Winn RK, Vedder NB, Doerschuk CM, Rice CL: In vivo models of leukocyte adherence to endothelium. In: *Adhesion: its role in inflammatory disease*, Eds. Harlan JM and Liu DY, Freeman, New York, 1992, pp 117-150
- Harno K, Nikkila EA, Kuusi T: Plasma HDL cholesterol and post heparin plasma hepatic endothelial lipase activity: relationship to obesity and non-insulin dependent diabetes. *Diabetologia* 19:281-289, 1980
- Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A: Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 77:757-761, 1986
- Heinecke JW: Cellular mechanisms for the oxidative modification of lipoproteins: implication for atherogenesis. *Coronary Artery Dis* 5:205-210, 1994
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6499-6503, 1981
- Henry RR: Glucose control and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 124:97-103, 1996
- Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM: Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 3:215-222, 1983
- Hiramastu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A: Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 7:55-60, 1987
- Hiramastu K, Arimori S: Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* 37:832-837, 1988
- Hoffman RM, Garewal HS: Antioxidants and the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 155:241-246, 1995

- Hoogerbrugge N, Verkerk A, Jacobs ML, Postema PTE, Jongkind JF: Hypertriglyceridemia enhances monocyte binding to endothelium in NIDDM. *Diabetes Care* 19:1122-1125, 1996
- Horiuchi S, Araki N, Morino Y: Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 266:7329-7332, 1991
- Horton ES: NIDDM - The devastating disease. *Diabetes Res Clin Pract* 28:S3-S11, 1995
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM: Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 94:1543-1549, 1994
- Howard BV, Abott WG, Beltz WF, Harper IT, Fields RM, Grundy SM, Taskinen MR: Integrated study of low density lipoprotein metabolism and very low density lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 36:870-877, 1987
- Howard BV, Howard WJ: Dyslipidaemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrine Rev* 15:263-274, 1994
- Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP: Autooxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39:1420-1424, 1991
- Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SSS, Hawa M, Viberti GC, Watkins PJ, Leslie RDG, Vergani D: Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 39:60-69, 1996
- Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y, Yamada N: Enhanced expression of platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor by high glucose. *Diabetes* 45:507-512, 1996
- Jacotot B: Introduction dans: *l'athérosclérose. Aspects fondamentaux*. Collection Lepetit, Paris, France, p. 7-11, 1982
- Jennings PE, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JJJ: Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetic patients: clinical assessment. *Metabolism* 41:36-39, 1992



- Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J: Human monocytes/macrophages release tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to oxidized-LDL. *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 16:1573-1579, 1996
- Juul K, Nielsen LB, Munkholm K, Stender S, Nordestgaard BG: Oxidation of plasma low-density lipoprotein accelerates its accumulation and degradation in the arterial wall in vivo. *Circulation* 94:1698-1704, 1996
- Kahn BB: Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45:1644-1654, 1996
- Kannel WB, McGee DL: Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham study. *JAMA* 241:2035-2038, 1979
- Kawamura M, Heinecke JW, Chait A: Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 94:771-778, 1994
- Kelley D, Mookan M, Mandarino L: Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes* 41:698-706, 1992
- Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 95:1262-1270, 1995
- Kim JA, Berliner JA, Natarajan RD, Nadler JL: Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes* 43:1103-1107, 1994
- King GL, Kunisaki M, Nishio Y, Inoguchi T, Shiba T, Xia P: Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 45:S105-S108, 1996
- Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H: Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9010-9014, 1990
- Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H: Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 90:439-446, 1992

- Koivisto VA: Insulin therapy in type II diabetes. *Diabetes Care* 16:29-39, 1993
- Koltermann O, Gray R, Griffin J: Receptor and postreceptor defects contribute to insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 68:957-969, 1981
- Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MJ: Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90:1138-1144, 1992
- Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H: Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11047-11052, 1996
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C: Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies in Pima Indians. *N Engl J Med* 329:1988-1992, 1993
- Lopes-Virella MF, Colwell JA: Pharmacologic treatment of lipid disorders in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 3:691-722, 1987
- Lopes-Virella MF, Virella G: Cytokines, modified lipoproteins, and arteriosclerosis in diabetes. *Diabetes* 45:S40-S44, 1996
- Luo M and O'Brien RC: Antioxidant effects of sulphonylureas (Abstract). *Diabetes* 45:123A, 1996
- Lyons TJ, Patrick JS, Baynes JW, Colwell JA, Lopes-Virella MF: Glycosylation of low-density lipoprotein in patients with type 1 diabetes: correlations with other parameters of glycaemic control. *Diabetologia* 29:685-689, 1986
- Lyons TJ: Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 41:67-73, 1992
- Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R: Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 267:5133-5138, 1992
- Martin BC, Warram JH, Krolewaki AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR: Role of insulin resistance in development of type II diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340:925-929, 1992

- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Rainton DF: GMP-140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 80: 535-544, 1989
- McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D: Oxidatively modified low-density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 92:1004-1008, 1993
- Mogensen CE, Andersen MJF: Increase kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 22:706-712, 1973
- Monnier L, Barjon JN, Percheron C, Colette C: Les anomalies lipidiques chez le diabétique. *Sang Thrombose Vaisseaux* 3:211-220, 1991
- Monnier L, Slama G, Vialettes B, Ziegler O: Nutrition et diabète. *Diabetes Metab* 21:207-216, 1995
- Mooradian AD, Reed RL, Meredith KE, Scuderi P: Serum levels of tumor necrosis factor and IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in diabetic patients. *Diabetes Care* 14:63-65, 1991
- Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4:357-364, 1984
- Morgan J, Smith JA, Wilkins GM, Leake DS: Oxidation of low density lipoprotein by bovine and porcine aortic endothelial cells and porcine endocardial cells in culture. *Atherosclerosis* 102:209-216, 1993
- Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F: The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann NY Acad Sci* 748:562-570, 1995
- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M: Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Com* 173:92-939, 1990
- Nathan DM, Singer DE, Godine JE, Perlmutter LC: Non-insulin-dependent diabetes in older patients: complications and risk factors. *Am J Med* 81:837-842, 1986
- Nathan DM: Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:1676-1685, 1993

- Nathan DM: The pathophysiology of diabetic complications: how much does the glucose hypothesis explain? *Ann Intern Med* 124:86-89, 1996
- Newman PJ: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99:3-8, 1997
- Nguyen P, Durlach V, Leutenegger M, Guenounou M, Potron G: Explosion respiratoire des polynucléaires neutrophiles et profil des cytokines chez le diabétique non insulinodépendant. *Journal des Maladies Vasculaires* 20:102-105, 1995
- Ohno Y, Aoki N, Nishimura A: In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1072-1077, 1993
- Okada M, Sugita O, Miida T, Matsuto T, Inano K: Effects of modified low density lipoprotein and hypoxia on the expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Presse Med* 24:483-488, 1995
- Oki JC: Dyslipidemias in patients with diabetes mellitus: classification and risks and benefits of therapy. *Pharmacotherapy* 15:317-337, 1995
- Palmer KJ, Brogden RN: Gliclazide: an update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in non-insulin-dependent diabetes mellitus *Drugs* 46:92-125, 1993
- Pankewycz OG, Guan JX, Benedict JF: Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocrine rev* 16:164-176, 1995
- Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D: A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1046-1050, 1989
- Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL: The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med* 43:219-225, 1992
- Paulson JC: Selectin/carbohydrate-mediated adhesion of leukocytes. In: *Adhesion: its role in inflammatory disease*, Eds. Harlan JM and Liu DY, Freeman, New York, 1992, pp 19-42
- Picard S: Rôle de l'oxydation des lipoprotéines dans la pathogénie de l'athérosclérose. *Path Biol* 44:46-50, 1996

- Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC: The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 66:921-933, 1991
- Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol rev* 70:427-451, 1990
- Polonsky KS, Sturis J, Bell GI: Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334:777-783, 1996
- Quinn MTS, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D: Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2995-2998, 1987
- Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and monocyte-macrophage chemotactic factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 344:254-257, 1990
- Rankin SM, Parthasarathy S, Steinberg D: Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res* 32:449-456, 1991
- Reaven GM: The role of insulin resistance and hyperinsulinemia in coronary heart disease. *Metabolism* 41:16-19, 1992
- Reaven PD, Witztum JL : Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Annu Rev Nutr* 16:51-71, 1996
- Rice-Evans C, Leake D, Bruckdorfer KR, Diplock AT: Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls. *Free Rad Res* 25:285-311, 1996
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N Engl J Med* 314:488-500, 1986
- Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M: Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J* 6:2905-2914, 1992
- Salyer JL, Bohnsack JF, Knape WA, Shigeoka AO, Ashwood ER, Hill HR: Mechanisms of TNF $\alpha$  alterations of PMN adhesion and migration. *Am J Pathol* 136:831-841, 1990
- Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K: Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 17:104-107, 1979.

- Schaefer EJ: *Lipoprotéines de haute densité et insuffisance coronarienne*. Ed: Gower Medical Publishing, New York, 1991
- Schmidt AM, Hori O, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D: The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consist of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 269:9882-9888, 1994
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li, JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D: Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96:1395-1403, 1995
- Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto, Stern D: A novel receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45:S77-S80, 1996
- Scholz D, Devaux B, Hirche A, Potzsch B, Kropp B, Schaper W, Schaper J: Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res* 284:415-423, 1996
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Cayatte AJ, Rozek MM: Pathogenesis of the atherosclerotic lesion. Implication for diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15:1156-1167, 1992
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA: A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 71:9B-14B, 1993
- Scott NA, Jennings PE, Brown J, Belch JFF: Gliclazide: a general free radical scavenger. *Eur J Pharmacol - Molecular Pharmacology Section* 208:175-177, 1991
- Sekizuka K, Tomino Y, Sei C, Kurusu A, Tashiro K, Yamaguchi Y, Kodera S, Hishiki T, Shirato I, Koide H: Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 68: 284-285, 1994
- Serri O, Renier G: Intervention in diabetic vascular disease by modulation of growth factors. *Metabolism* 44:83-90, 1995

- Setiadi H, Wautier JL, Courillon-Mallet A, Passa P, Caen J: Increased adhesion to fibronectin and Mo-1 expression by diabetic monocytes. *J Immunol* 138:3230-3234, 1987
- Singer DE, Nathan DM, Anderson KM, Wilson PWF, Evans JC: Association of HbA1c with prevalent cardiovascular disease in the original cohort of the Framingham Heart Study. *Diabetes* 41:202-208, 1992
- Sjaastad MD, Nelson WJ: Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *BioEssays* 19:47-55, 1997
- Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN: Atherogenic modified LDL in diabetes. *Diabetes* 45:S35-S39, 1996
- Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D: A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 264:2599-2604, 1989
- Sparrow CP, Olszewski J: Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions. *J Lipid Res* 34:1219-1228, 1993
- Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434, 1990
- Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multiple step paradigm. *Cell* 76:311-314, 1994
- St Clair RW: Effects of estrogens on macrophage foam cells: a potential target for the protective effects of estrogens on atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 8:281-286, 1997
- Staunton DE, Dustin ML, Springer TA: Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339:61-64, 1989
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-923, 1989
- Steinbrecher UP: Role of superoxide in endothelial-cell modification of lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 959:20-30, 1988

- Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernst B, Blann AD: Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thrombosis and Haemostasis* 72:979-984, 1994
- Stewart MW, Laker MF, Dyer RG, Game F, Mitcheson J, Winocour PH, Alberti KGMM: Lipoprotein compositional abnormalities and insulin resistance in type II diabetic patients with mild hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 13:1046-1052, 1993
- Taki H, Kashiwagi A, Tanaka Y, Horike K: Expression of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) via an osmotic effect in human umbilical vein endothelial cells exposed to high glucose medium. *Life Sciences* 58:1713-1721, 1996
- Taskinen MR, Beltz WF, Harper I, Fields RM, Schonfeld G, Grundy SM: Effects of NIDDM on very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B metabolism. Studies before and after sulfonylurea therapy. *Diabetes* 35:1268-1277, 1986
- Taskinen MR, Kuusi T, Helve E, Nikkila EA, Yki-Jarvinen H: Insulin therapy induces antiatherogenic changes of serum lipoproteins in noninsulin dependent diabetes. *Arteriosclerosis* 8:168-177, 1988
- Thies FS, Molina JM, Ciaraldi TP, Freidenberg TP, Olefsky JM: Insulin receptor autophosphorylation and endogenous substrate phosphorylation in human adipocytes from control obese, and NIDDM subjects. *Diabetes* 39:250-259, 1990
- Thomas CE, Jackson RL: Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent and -independent oxidation of low density lipoproteins. *J Pharmacol Exp Ther* 256:1182-1188, 1991
- Thomas F, Balkau B, Vauzelle-Kervroedan F: Maternal effect and familial aggregation in NIDDM. The CORIAD study. *Diabetes* 43:63-67, 1994
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 389:610-614, 1997
- Van Hinsbergh VWM, Schefer M, Havekes L, Kemper HJM: Role of endothelial cells and their products in the modification of low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 878:49-64, 1986



- Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A: Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 240:1546-1548, 1988
- Vlassara H: Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med* 124:19-30, 1994
- Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M: Advanced glycation endproducts promote adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Molec Med* 1:447-456, 1995
- Vlassara H: Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med* 28:419-426, 1996
- Walker JD, Viberti GC: Aetiology and pathogenesis of diabetic nephropathy: clues from early functional abnormalities. In: *Chronic complications of diabetes* Edited by John C. Pickup & G Williams. Blackwell scientific publications. London. p 146-161, 1994
- Wang J, Beekhuisen H, van Furth R: Surface molecules involved in the adherence of recombinant interferon-gamma (rIFN- $\gamma$ )-stimulated human monocytes to vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 95:263-269, 1994
- Weber C, Erl W, Pietsh A, Strobel M, Ziegler-Heibroek HWL, Weber PC: Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilisation and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* 14:1665-1673, 1994
- Weber C, Erl W, Pietsh A, Weber PC: Aspirin inhibits nuclear factor-kappaB mobilisation and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 91:1914-1917, 1995
- Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA: Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion. Signal integration and NF- $\kappa$ B translocation. *J Clin Invest* 95:2297-2303, 1995
- Wissler RW: Coronary atherosclerosis and ischemic heart disease in: *Brain and heart infarct*, Eds: Zulch KJ, Kaufman W, Hossmann KA, Hosmann V, Springer-Verlag Berlin, Germany, 1977, pp:206-231

- Witztum JL, Steinberg D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785-1792, 1991
- Wolff SP, Dean RT: Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of oxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 245:243-250, 1987
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897, 1994
- Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, Vlassara H: Two novel rat renal membrane proteins that bind advanced glycosylation end products: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* 174:515-524, 1991
- Young K, Khwaja A (1990) Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev* 4:211-225, 1990